

日本国特許 PATENT OFFICE

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP00/01608

1 2.04.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application:

1999年 8月 6日

REC'D 0.5 JUN 2000

WIPO

出 願 番 号 Application Number:

平成11年特許願第224679号

出 願 人 Applicant (s):

藤沢薬品工業株式会社

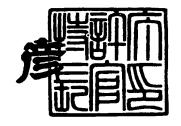
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN

2000年 5月19日

特許庁長官 Commissioner, Patent Office

近藤隆



【書類名】

特許願

【整理番号】

A4029

【提出日】

平成11年 8月 6日

【あて先】

特許庁長官殿

【国際特許分類】

C12N 9/04

C12N 1/21

C12N 15/53

C12P 7/60

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区松竹町1-38 プリオール牧

3 B

【氏名】

柴田 孝

【発明者】

【住所又は居所】

愛知県東海市加木屋町泡池11-237

【氏名】

市川 千代

【発明者】

【住所又は居所】

愛知県一宮市今伊勢町宮後字宮代62-1 ソレーユ宮

代305

【氏名】

松浦 光高

【発明者】

【住所又は居所】

愛知県海部郡甚目寺町大字下萱津字五反田 3 1-1

【氏名】

野口 祐嗣

【発明者】

【住所又は居所】

兵庫県川西市美山台1-4-20

【氏名】

斎藤 善正

【発明者】

【住所又は居所】

茨城県つくば市並木3-11-11

【氏名】

山下 道雄

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区西中島2-14-10-405

【氏名】 ▲高▼田 葉子

【特許出願人】

【識別番号】 000005245

【氏名又は名称】 藤沢薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080791

【弁理士】

【氏名又は名称】 高島 一

【電話番号】 06-6227-1156

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006965

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9715693

【プルーフの要否】 要

特平11-224679

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ソルビトールデヒドロゲナーゼ、それをコードする遺伝子およ びそれらの用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有するソルビトールデヒドロゲナーゼ

- (a) 作用: D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒する
- (b) 分子量:約54kDa
- (c) 補酵素: NAD (P) + 依存性
- (d) 基質特異性:ソルビトール、マンニトール、アラビトールを特異的に酸化 し、キシリトール、リビトール、イノシトール、グリセロールに作用しない

【請求項2】 グルコノバクター・オキシダンスG624株由来である請求 項1記載のソルビトールデヒドロゲナーゼ。

【請求項3】 請求項2記載のソルビトールデヒドロゲナーゼと分子進化上 、同一の遺伝子を起源とするソルビトールデヒドロゲナーゼ。

【請求項4】 グルコノバクター属に属する細菌由来である請求項3記載の ソルビトールデヒドロゲナーゼ。

【請求項5】 以下の(a) または(b) の蛋白質であるソルビトールデヒドロ ゲナーゼ。

- (a) 配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質
- (b) 上記(a) のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置 換、挿入、付加もしくは修飾されたアミノ酸配列からなり、且つDーソルビトー ルをLーソルボースに変換する反応を触媒する蛋白質

【請求項6】 請求項1~5のいずれかに記載のソルビトールデヒドロゲナ ーゼをコードするDNA。

【請求項7】 以下の(a) または(b) のDNAである請求項6記載のDNA

(a) 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537~1991で示さ れる塩基配列からなるDNA

(b) 上記(a) の塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得るDNA

【請求項8】 グルコノバクター属に属する細菌由来である請求項6または7記載のDNA。

【請求項9】 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537~1991で示される塩基配列からなるDNAおよびその部分DNAとハイブリダイズし得るDNAであって、ソルビトールデヒドロゲナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項10】 請求項9記載の遺伝子によってコードされ、ソルビトール デヒドロゲナーゼ活性を有するグルコノバクター属由来の蛋白質。

【請求項11】 以下の(a) または(b) のDNAからなるプロモーター遺伝子。

- (a) 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号1~536で示される塩 基配列からなるDNA
- (b) 上記(a) の塩基配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入 、付加もしくは修飾された塩基配列からなり、且つ少なくとも1種の微生物にお いてプロモーター活性を有するDNA

【請求項12】 請求項6~9のいずれかに記載のDNAを含む組換えベクター。

【請求項13】 請求項6~9のいずれかに記載のDNAを含む発現ベクタ -。

【請求項14】 ソルボースデヒドロゲナーゼをコードするDNAおよび/またはソルボソンデヒドロゲナーゼをコードするDNAをさらに含む請求項13 記載の発現ベクター。

【請求項15】 請求項13または14記載の発現ベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

【請求項16】 大腸菌、シュードモナス属、グルコノバクター属、アセトバクター属およびシュードグルコノバクター属からなる群より選択される属に属する請求項15記載の形質転換体。

特平11-224679

【請求項17】 D-ソルビトールを2-ケトーLーグロン酸に変換する能力を有する請求項15または16記載の形質転換体。

【請求項18】 請求項13記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から請求項1~5のいずれかに記載のソルビトールデヒドロゲナーゼまたは請求項10記載の蛋白質を採取することを含むソルビトールデヒドロゲナーゼ活性を有する蛋白質の製造方法。

【請求項19】 請求項13記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物にD-ソルビトールを接触させる工程を含むL-ソルボースの製造方法。

【請求項20】 ソルボースデヒドロゲナーゼをコードするDNAおよびソルボソンデヒドロゲナーゼをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に請求項19記載の方法により得られるLーソルボースを接触させる工程を含む2ーケトーLーグロン酸の製造方法。

【請求項21】 請求項17記載の形質転換体を培地中で培養し、得られる 培養物またはその処理物にD-ソルビトールを接触させる工程を含む2-ケトー L-グロン酸の製造方法。

【請求項22】 請求項20または21記載の方法により得られる2-ケトーLーグロン酸を、Lーアスコルビン酸またはそのアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩に変換する工程を含む、Lーアスコルビン酸またはそのアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩の製造方法。

【発明の詳細な説明】

[0001]

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規ソルビトールデヒドロゲナーゼ(本発明において、ソルビトールデヒドロゲナーゼとはDーソルビトールを酸化してLーソルボースに変換する反応を触媒し得る酵素を意味するものとする;以下、SLDHという)、それをコードする遺伝子、該遺伝子を用いた遺伝子操作によるLーソルボースおよび2ーケトーLーグロン酸(以下、2KLGAという)の製造方法、並びにそれらの

製造に関わる発現系に関する。また、本発明は上記方法により得られる2KLG Aを利用したL-アスコルビン酸またはその塩の製造方法に関する。

[0002]

【従来の技術】

Lーソルボースはライヒシュタイン法によるLーアスコルビン酸(ビタミンC)合成における重要な中間体である(図1を参照)。Dーソルビトールを化学的に酸化すると生成物の約半分がDーソルボースになるのに対し、SLDH活性を有する微生物にDーソルビトールを接触させると約95%の収率でL体のみが得られることから、DーソルビトールをLーソルボースに変換する工程には従来より発酵法が用いられてきた。

[0003]

一方、2KLGAは、工業的にはL-ソルボースを化学的に酸化することにより合成されている。L-ソルボースデヒドロゲナーゼ(SDH)およびL-ソルボソンデヒドロゲナーゼ(SNDH)による2段階の酵素的酸化反応を経由してL-ソルボースを2KLGAに変換する微生物が知られてはいるが、いずれも2KLGAの生産量が低いのが現状である。

[0004]

発酵法によって2KLGAを従来よりも効率よく生成させ得る方法として、SLDH遺伝子を単離し、これをSDHおよびSNDH活性を有する微生物に導入することによりD-ソルビトールから2KLGAを合成することができる組換え微生物を作製し、該微生物にD-ソルビトールを接触させる方法が考えられる。

[0005]

これまでにいくつかのタイプのSLDHが単離されている [Agric. Biol. Chem., 46(1), 135-141 (1982); Biokhimiia, 43(6), 1067-1078 (1978); J. Biol. Chem., 224, 323 (1957); J. Biol. Chem., 226, 301 (1957); J. Bacteriol., 71, 737 (1956)]。本発明者らはすでに、グルコノバクター・オキシダンス (Gluconobacter oxydans) に属する菌株から、膜結合型で大小2つのサブユニットからなり、さらにチトクローム c 様ポリペプチドと結合して作用するSLDHをコードする遺伝子を単離している (特願平9-285280号)。しかしなが

19T1 224073

ら、他のタイプのSLDH遺伝子のクローニングについては、これまで報告がな されていない。

[0006]

【発明が解決しようとする課題】

したがって、本発明の目的は、2KLGAの発酵生産に有用な新規SLDH遺伝子を提供することであり、また、該遺伝子で形質転換された宿主微生物、特にSDHおよびSNDH活性をすでに有する宿主に該遺伝子を導入した形質転換体、あるいはSDH遺伝子およびSNDH遺伝子とともに該遺伝子を導入した形質転換体を提供することである。さらに、本発明の目的は、該微生物を用いてDーソルビトールからLーソルボースまたは2KLGAを製造する方法を提供することである。また、本発明の別の目的は、該SLDH遺伝子で形質転換された宿主微生物の培養による組換えSLDHの製造方法並びに該SLDHを用いた酵素法によるLーソルボースの製造方法を提供することである。

[0007]

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、SLDH活性を有するグルコノバクター属の菌株の染色体DNAライブラリーから、該酵素のコード領域を含むDNAをクローニングすることに成功した。シークエンスの結果、該DNAは本発明者らが以前に単離したSLDH遺伝子とは全く異なる、新規なSLDH遺伝子を含むことが確認された。さらに、本発明者らは該DNAを含む発現ベクターでシュードモナスを形質転換し、該組換えシュードモナスの培養物から組換えSLDHを精製することに成功した。また、該DNAを含む発現ベクターで形質転換されたシュードモナスを、SDH遺伝子およびSNDH遺伝子を含む発現ベクターでさらに形質転換し、該形質転換体の培養物を用いてDーソルビトールを2KLGAに効率よく変換することに成功し、本発明を完成するに至った。

[0008]

すなわち、本発明は以下に示す通りである。

(1) 下記の理化学的性質を有するSLDH。

- (a) 作用: D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒する
- (b) 分子量:約54kDa
- (c) 補酵素: NAD (P) + 依存性
- (d) 基質特異性:ソルビトール、マンニトール、アラビトールを特異的に酸化し、キシリトール、リビトール、イノシトール、グリセロールに作用しない
- (2) グルコノバクター・オキシダンスG624株由来である上記(1)のSLDH。
- (3)上記(2)記載のSLDHと分子進化上、同一の遺伝子を起源とするSLDH。
- (4)グルコノバクター属に属する細菌由来である上記(3)記載のSLDH。
- (5) 以下の(a) または(b) の蛋白質であるSLDH。
 - (a) 配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質
- (b) 上記(a) のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾されたアミノ酸配列からなり、且つD-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒する蛋白質
- (6)上記(1) \sim (5)のいずれかのSLDHをコードするDNA。
- (7)以下の(a) または(b) のDNAである上記(6)のDNA。
- (a) 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537~1991で示される塩基配列からなるDNA
- (b) 上記(a) の塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得るD NA
- (8) グルコノバクター属に属する細菌由来である上記(6) または(7) のD NA。
- (9)配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537~1991で示される塩基配列からなるDNAおよびその部分DNAとハイブリダイズし得るDNAであって、SLDH活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。
- (10)上記(9)の遺伝子によってコードされ、SLDH活性を有するグルコ ノバクター属由来の蛋白質。
- (11)以下の(a) または(b) のDNAからなるプロモーター遺伝子。

- (a) 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号1~536で示される塩 基配列からなるDNA
- (b) 上記(a) の塩基配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾された塩基配列からなり、且つ少なくとも1種の微生物においてプロモーター活性を有するDNA
- (12) 上記 (6) ~ (9) のいずれかのDNAを含む組換えベクター。
- (13) 上記(6)~(9) のいずれかのDNAを含む発現ベクター。
- (14) SDHをコードするDNAおよび/またはSNDHをコードするDNA をさらに含む上記(13)の発現ベクター。
- (15)上記(13)または(14)の発現ベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。
- (16) 大腸菌、シュードモナス属、グルコノバクター属。アセトバクター属およびシュードグルコノバクター属からなる群より選択される属に属する上記(15)の形質転換体。
- (17) 該形質転換体がD-ソルビトールを2KLGAに変換する能力を有する ものである上記(15)または(16)の形質転換体。
- (18)上記(13)の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から上記(1)~(5)および(10)のいずれかのSLD H活性を有する蛋白質を採取することを含む該蛋白質の製造方法。
- (19)上記(13)の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養 し、得られる培養物またはその処理物にD-ソルビトールを接触させる工程を含 むL-ソルボースの製造方法。
- (20) SDHをコードするDNAおよびSNDHをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に上記(19) の方法により得られるL-ソルボースを接触させる工程を含む2KLGAの製造方法。
- (21)上記(17)の形質転換体を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物にD-ソルビトールを接触させる工程を含む2KLGAの製造方法。
- (22) 上記(20) または(21) の方法により得られる2KLGAを、L-



アスコルビン酸またはそのアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩に変換する工程を含む、L-アスコルビン酸またはそのアルカリ金属塩もしくはアルカリ 土類金属塩の製造方法。

[0009]

【発明の実施の形態】

本発明のSLDHは、D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒する、分子量約54kDaの蛋白質であり、補酵素としてNADP⁺ またはNAD⁺ を要求することを特徴とする。本酵素はソルビトールの他、マンニトール、アラビトールを特異的に酸化することができるが、キシリトール、リビトール、イノシトール、グリセロールには作用しない。

[0010]

本発明のSLDHは、上記の特徴を有する限りその由来に特に制限はなく、天 然に存在する生物起源のものの他、自然もしくは人工の突然変異体、あるいは異 種、すなわち外来のSLDH遺伝子を導入して得られる形質転換体由来のものも すべて包含される。好ましくは酢酸菌、特にグルコノバクター属に属する細菌、 より好ましくはグルコノバクター・オキシダンス、就中グルコノバクター・オキ シダンスG 6 2 4 株(F E R M B P - 4 4 1 5 ; 国際出願公開W O 9 5 / 2 3 220号公報) 由来のSLDHが例示される。また、別の好ましい態様において は、本発明のSLDHは、G. オキシダンスG624株由来のSLDHと分子進 化上、同一の遺伝子を起源とするSLDHである。ここで、「分子進化上、同一 の遺伝子を起源とする」とは、そのDNA配列分析、生理学的役割等の解析によ り、分子進化上、G.オキシダンスG624株由来のSLDHと同一の遺伝子を 起源として進化してきたと合理的に判断されるSLDHをいい、これらはDNA 配列上、高度な相同性を保持している。これらのSLDHは、好ましくは、G. オキシダンスG624株由来のSLDHと、DNA配列において60%以上、最 も好ましくは80%以上の相同性を示すものである。これらは、後で詳述するよ うに、配列表配列番号2に示されるDNA配列をもとに、適当なプライマーを用 いてPCR法により、あるいは適当なプローブを用いてハイブリダイゼーション 法によりその遺伝子をクローニングすることができる。



[0011]

さらに好ましい態様においては、本発明のSLDHは配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、またはSLDH活性を損なわない範囲で、該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾されたアミノ酸配列からなる蛋白質である。

[0012]

本発明のSLDHは、(1) 該酵素を産生する細胞または組織の培養物を原料として単離精製する方法、(2) 化学的に合成する方法または(3) 遺伝子組換え技術によりSLDHを発現するように操作された細胞から精製する方法等を適宜用いることによって取得することができる。

[0013]

天然のSLDH産生細胞からのSLDHの単離精製は、例えば以下のようにし て行うことができる。すなわち、適当な液体培地中で該細胞を培養し、得られる 培養物からSLDH活性を含む画分を分離回収する。例えば、該酵素が細胞質に 局在する場合(本発明のSLDHはNAD(P) + 依存性であることから、細胞 質に局在することが予測される)、培養物を遠心および/または濾過して菌体を 回収後、超音波処理やリゾチーム処理および浸透圧ショック等により該菌体を破 砕し、10,000~40,000rpm程度で遠心して上清(可溶性画分)を 回収する。目的のSLDHは、得られた可溶性画分から、酵素蛋白質の分離精製 に常套的に利用されている分離技術を適宜組み合わせることによって精製するこ とができる。このような分離技術としては、例えば、塩析、溶媒沈澱法等の溶解 度の差を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、非変性ポリアクリルアミド ゲル電気泳動(PAGE)、SDS-PAGE等の分子量の差を利用する方法、 イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー等 の荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー等の特異的親和性を 利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性を利用する方法、等 電点電気泳動等の等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

[0014]

化学合成による本発明のSLDHの製造は、例えば配列表配列番号1に示され

るアミノ酸配列を基にして、各配列の全部または一部をペプチド合成機を用いて 合成し、得られるポリペプチドを適当な再生条件下で再生 (renaturation) させ ることにより行うことができる。

[0015]

しかしながら、本発明の一実施態様であるG. オキシダンスG624由来のSLDHは、非生理学的な条件において非常に不安定な酵素であるため、上記の方法では精製の途中で酵素が失活する場合がある。このような酵素は、ヒスチジンタグ法、GST法等の、特定物質にアフィニティーのある付加・改変配列を利用したアフィニティークロマトグラフィーで素早く精製することができる。したがって、本発明のSLDHの特に好ましい取得方法は、以下に詳述するように、該酵素を有する細胞のDNAから該酵素をコードするDNAをクローニングし、さらに遺伝子操作により、金属イオンキレートに吸着し得るアミノ酸配列をコードする核酸配列を該DNAに付加する工程を含むものである。

[0016]

酵素遺伝子のクローニングは、通常、以下の方法により行われる。まず、所望の酵素を産生する細胞または組織より、該酵素を上記のような手段により完全または部分精製し、N末端アミノ酸配列をエドマン法により決定する。また、該酵素を配列特異的プロテアーゼで部分分解して得られるオリゴペプチドのアミノ酸配列を同様にエドマン法により決定する。決定された部分アミノ酸配列に対応する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーまたはプローブとして用いて、該酵素を産生する細胞または組織より調製されたRNAまたはDNAからPCR法またはコロニー(もしくはプラーク)ハイブリダイゼーション法によって該酵素をコードするDNAをクローニングする。

[0017]

あるいは、完全または部分精製された酵素の全部または一部を抗原として該酵素に対する抗体を常法にしたがって作製し、該酵素を産生する細胞または組織より調製されたcDNAまたはゲノミックDNAライブラリーから、抗体スクリーニングにより該酵素をコードするDNAをクローニングすることもできる。

[0018]

しかしながら、上記のG. オキシダンスG624由来SLDHのように、不安定で精製が困難な酵素については、その酵素活性をマーカーとして、ゲノミックDNAライブラリーから該酵素の遺伝子をそのプロモーター配列を含む断片としてスクリーニングすることができる。SLDHは、DーソルビトールをLーソルボースに変換するので、生成するLーソルボースを検出することによりSLDH活性を有するクローンを選択することができる。なお、本法の適用にあたっては、技術的困難を伴う場合が多い。

[0019]

具体的には、まずSLDH活性を有する細胞または組織から染色体DNAを常法により単離し、これを適当な制限酵素で分解して、好ましくは染色体DNA内に多数の制限部位を有する制限酵素で部分分解して、得られる断片を適当なクローニングベクター中に挿入する。クローニングベクターとしては、プラスミドベクター、ファージベクター等が挙げられるが、大きなDNAインサートを収容できて、且つコロニーとして回収できることから、コスミドベクターやシャロミドベクターが好ましい。ファージベクターやコスミドベクター等を用いる場合は、さらにインビトロパッケージングを行って、ゲノミックDNAライブラリーを得る。

[0020]

コスミドライブラリーを用いる場合は、上記のようにして得られるパッケージング液で適当な指示菌、好ましくは高形質転換能を有する大腸菌コンピテント細胞を感染させた後、固形培地上にプレートして培養する。生じた各コロニーを個別にDーソルビトールを含む液体培地に植菌して培養する。培養終了後、培養上清を回収して、例えば、レゾルシンー塩酸反応 (Cohen, J. Biol. Chem., 201, 71, 1953)、レゾルシンー第二鉄塩ー塩酸反応 (Kulka, Biochem. J., 63, 542, 1956)のようなケトへキソースの呈色反応を用いてSLDH活性を有するクローンの候補を選択する。

[0021]

得られたクローンが実際にSLDH活性を有する(すなわち、D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する)ことは、例えば、HPLC等により培養上清中

のソルボースを検出することにより確認される。

[0022]

コスミドクローンのDNAインサートは35~45kbと非常に大きいので、プラスミドへのサブクローニングを容易にするために、予めインサートDNAの非SLDH遺伝子領域の一部を除いて縮小化するのが望ましい。このようなDNAインサートの縮小化方法としては、例えばシャロミドベクター等へのサブクローニングが挙げられる。シャロミドベクターは種々の長さのスペーサーDNAを有するので、コスミドベクターよりも小さな種々の長さのDNAをクローニングできる。本発明においては、例えば、約10~20kbのDNAインサートを収容し得るシャロミドベクターが好ましく使用される。SLDH活性を有するシャロミドクローンは上述の方法により選択することができる。

[0023]

プラスミドベクターへのサブクローニングは、例えば、上記のようにして得られる複数のシャロミドクローンについて制限酵素マッピングを行い、SLDH遺伝子内に制限部位が存在しないことがわかった制限酵素を用いてDNAインサートをさらに縮小化し、同様に制限酵素処理したプラスミドベクターとライゲーションさせることにより行うことができる。

[0024]

上記のストラテジーとは別に、本発明のSLDHをコードするDNAは、PCR法を用いて直接クローニングすることもできる。すなわち、該酵素活性を有する細胞または組織由来のゲノミックDNAまたはcDNA(もしくはmRNA)を鋳型とし、増幅断片がSLDHのコード領域をカバーするような適当なオリゴヌクレオチドの対をプライマーとして用いて、常法に従ってPCRを行うことにより、SLDHのコード領域を含むDNA断片を増幅することができる。このような方法は、配列既知のSLDHと分子進化上、同一の起源を有するSLDH遺伝子のクローニングにおいて特に有用である。例えば、G.オキシダンスG624株由来のSLDHと分子進化上、同一の起源を有すると推定される他の細菌由来のSLDH遺伝子をクローニングする場合、配列表配列番号2に示されるDNA配列に基づいて、該配列中塩基番号537~1991で示される塩基配列を含

むDNA断片と高度に相同性を有するDNA断片を増幅し得るようなセンスおよびアンチセンスプライマーを構築してPCR法を実施すればよい。一方、目的のSLDHと高度な相同性を有するSLDHのDNA配列が未知の場合でも、例えば、5、上流領域の比較的保存されている幾つかの配列をセンスプライマー、3、下流領域の比較的保存されている幾つかの相補鎖配列をアンチセンスプライマーとして、PCRを行うことにより、該SLDH遺伝子をクローニングすることができる。SLDHの上下流配列が未知の場合、鋳型DNAと使用するプライマーとがある程度のミスマッチを含んでいても結合可能な程度に、アニーリング温度を低く設定する必要がある。したがって、PCR産物は目的のSLDH遺伝子を含む断片の他に、非特異的な増幅断片を含んだ混合物となる可能性がある。この場合、得られた増幅断片を、適当なクローニングベクター(例えば、TAクローニング用のプラスミドベクター等)、あるいは目的の増幅断片がプロモーター領域を含まない場合は、発現ベクターにクローニングし、これで大腸菌などのコンピテント細胞を形質転換して、上述の方法によりSLDH活性を有する形質転換体をスクリーニングすればよい。

[0025]

配列既知のSLDHと分子進化上、同一の起源を有するSLDH遺伝子のクローニングにおいては、さらに別のストラテジーとして、SLDH活性を有する細胞または組織由来のゲノミックDNAまたはcDNA(もしくはmRNA)を鋳型とし、既知DNA配列の全部または一部をプローブとして用いて、サザン法等のハイブリダイゼーション法により、直接クローニングする方法が挙げられる。ハイブリダイゼーションの条件は、DNAの由来により、ストリンジェンシーを適宜変化させて用いることができる。例えば、クローニングしようとする微生物の近縁度合い等から、その条件を、塩基配列において約60%以上の相同性を有する配列のみがハイブリッドを形成する条件、また、約80%以上の相同性を有する配列のみがハイブリッドを形成する条件、また、約80%以上の相同性を有する配列のみがハイブリッドを形成する条件などに、適宜変化させて用いることができる。

[0026]

上記のようにして得られたDNAインサートの塩基配列は、マキサム・ギルバ

ート法やジデオキシターミネーション法等の公知のシークエンス技術を用いて決 定することができる。

[0027]

本発明のSLDHをコードするDNAは、好ましくは、配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列(但し、該変異アミノ酸配列からなる蛋白質がDーソルビトールをLーソルボースに変換する反応を触媒し得る)をコードするDNAである。さらに好ましくは、本発明のSLDHをコードするDNAは、配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537~1991で示される塩基配列から実質的になるDNAである。ここで、「実質的になるDNA」とは、該特定塩基配列からなるDNAに加えて、該特定塩基配列からなるDNAに加えて、該特定塩基配列からなり、且つ該特定塩基配列からなるDNAがコードする蛋白質と同様の理化学的性質を有する蛋白質をコードするDNAを意味する。また、ここで「ストリンジェントな条件」とは、塩基配列において約60%以上の相同性を有するDNAがハイブリダイズし得る条件をいう。ストリンジェンシーは、ハイブリダイズ反応や洗浄の際の温度、塩濃度等を適宜変化させることにより調節することができる。

[0028]

また、別の本発明のDNAは、配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537~1991で示される塩基配列およびその部分DNAとハイブリダイズし得る塩基配列からなり、且つSLDH活性を有する蛋白質をコードする遺伝子をも包含する。したがって、該遺伝子によってコードされるSLDH活性を有する蛋白質、特にグルコノバクター属由来である蛋白質もまた、本発明の範囲に包含される。

[0029]

本発明のDNAは、上記のようにしてゲノミックDNAから得られるDNAだけでなく、mRNAから得られるcDNAであっても、あるいは配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537~1991で示される塩基配列を基にして、化学的に合成されるDNAであってもよい。

[0030]

上記のようにSLDH活性を指標としてゲノミックDNAから得られた、SLDHをコードするDNAは、その5'上流領域にプロモーター遺伝子配列を含んでいる。該プロモーター遺伝子は、好ましくは、配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号1~536で示される塩基配列、または該塩基配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾された塩基配列からなり、且つ少なくとも1種の微生物においてプロモーター活性を有するDNAである。ここで「微生物」としては、細菌(例えば大腸菌、枯草菌、シュードモナス、グルコノバクター、シュードグルコノバクター、アセトバクター等)および放線菌などの原核生物、並びに酵母等の一部の真核生物が好ましく例示される

[0031]

本発明はまた、本発明のSLDHをコードするDNAを含む組換えベクターを提供する。本発明の組換えベクターは、原核および/または真核細胞の各種宿主細胞内で複製保持または自律増殖できるものであれば特に限定されず、プラスミドベクターおよびファージベクター等が包含される。当該組換えベクターは、簡便には当該分野において入手可能なクローニングベクターまたは発現ベクターに、SLDHをコードするDNAを適当な制限酵素部位を利用して挿入することによって調製することができる。

[0032]

特に、本発明の組換えベクターは、ある宿主細胞内で機能的なプロモーターの 制御下にSLDHをコードするDNAが配置された発現ベクターである。使用さ れるベクターとしては、原核および/または真核細胞の各種宿主細胞内で機能し て、その下流に配置された遺伝子の転写を制御し得るプロモーター領域と、該遺 伝子の転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含有し、該プロモータ ー領域と該ターミネーター領域とが少なくとも1つの制限酵素認識部位、好まし くはユニークな制限部位を含む配列を介して連結されたものであれば特に制限は ないが、形質転換体選択のための選択マーカー遺伝子をさらに含有していること が好ましい。さらに所望により、該発現ベクターは、開始コドンおよび終止コド ンを、それぞれプロモーター領域の下流およびターミネーター領域の上流に含ん でいてもよい。

[0033]

宿主細胞として細菌を用いる場合、一般に発現ベクターは上記のプロモーター 領域およびターミネーター領域に加えて、宿主細胞内で自律複製し得る複製可能 単位を含む必要がある。プロモーター領域には、プロモーター、オペレーターお よびShine-Dalgarno(SD)配列が含まれる。例えば、宿主が大腸菌の場合には 、プロモーター領域としてtrpプロモーター、lacプロモーター、recA プロモーター、1ppプロモーター、tacプロモーター等が、また、宿主が枯 草菌の場合には、プロモーター領域としてSPO1プロモーター、SPO2プロ モーター、penPプロモーター等が挙げられる。ターミネーター領域としては 、通常使用されている天然または合成のターミネーターを用いることができる。 また、選択マーカー遺伝子としては、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマ イシン等の各種薬剤に対する耐性遺伝子を用いることができる。開始コドンとしては できる。 終止コドンとしては常用のTGA、TAAおよびTAGが用いられる。

[0034]

本発明のSLDHをコードするDNAが該酵素を産生する細胞または組織由来のゲノミックDNAから調製され、本来のプロモーターおよびターミネーター領域を含有する形態で得られる場合には、本発明の発現ベクターは、形質転換しようとする宿主細胞内で複製保持または自律増殖できる公知のクローニングベクターの適当な部位に該DNAを挿入することによって調製することができる。用いられるクローニングベクターとしては、宿主が細菌の場合、大腸菌由来のPBR系ベクター、PUC系ベクター等、あるいは枯草菌由来のPUB110、PTP5、PC194等が例示される。

[0035]

本発明のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターが、組換えSLDHの製造のために使用される場合、特に該SLDHが非常に不安定で、通常の精製法では精製途中で酵素が失活する可能性がある場合には、以下のような改変SL

特平11-224679

DHコーディング配列を含む発現ベクターを用いることが特に好ましい。該改変 SLDHコーディング配列は、本来のSLDHアミノ酸配列の末端にSLDHの 精製を迅速化し得る特定のアミノ酸配列が付加された形態で、SLDHが発現す るように、本来のSLDHコーディング配列の末端に該特定アミノ酸配列をコー ドする塩基配列が付加された配列からなる。SLDHの精製を迅速化し得る特定 のアミノ酸配列としては、金属イオンキレートに吸着し得るアミノ酸配列、好ま しくはヒスチジン、リジン、アルギニン等の塩基性アミノ酸からなる配列、より 好ましくはヒスチジンからなる配列が挙げられる。このような配列はSLDHの アミノ末端またはカルボキシル末端に付加することができるが、カルボキシル末 端に付加するのがより好ましい。このような改変SLDHコーディング配列は、 本来のSLDHコーディング配列の末端配列と一致する塩基配列に、付加すべき アミノ酸配列をコードする塩基配列を付加してなるオリゴヌクレオチドを合成し 、これを一方のプライマーとして用い、SLDH DNAを鋳型としてPCRを 行うことにより構築することができる。結果として得られる組換えSLDHは、 以下に詳述するように、付加されたアミノ酸配列を吸着させ得る金属イオンキレ ートを固定化した担体を用いて迅速に単離精製することができる。

[0036]

また、本発明のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターが、2KLGAの製造のために使用される場合には、当該DNAに加えて、SDHおよび/またはSNDHをコードするDNAを、宿主細胞内で発現し得る形態で含有する発現ベクターを用いることもできる。SLDHをコードするDNA、SDHをコードするDNAおよびSNDHをコードするDNAは、それぞれ別のプロモーターの制御下に置かれてもよく、あるいはそのうちの2つ以上が同一のプロモーターの制御下にタンデムに配置してもよい。

[0037]

本発明の形質転換体は、本発明のSLDHをコードするDNAを含有する組換 えベクターで宿主細胞を形質転換することにより調製することができる。宿主細 胞は使用する組換えベクターに適合し、形質転換され得るものであれば特に限定 されず、当分野で通常使用される天然に存在する細胞あるいは人工的に作製され た変異体細胞もしくは組換え体細胞など種々の細胞が利用できる。好ましくは細菌、特に大腸菌(例えばDH5 α、HB101等)、枯草菌、シュードモナス属細菌(例えばシュードモナス・フルオレセンス等)、グルコノバクター属細菌(例えばグルコノバクター・オキシダンス等)、シュードグルコノバクター属細菌、アセトバクター属細菌等である。

[0038]

組換えベクターの宿主細胞への導入は従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、宿主が大腸菌や枯草菌等の細菌の場合には、Cohen らの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 2110 (1972)]、プロトプラスト法[Mol. Gen. Gen et., 168: 111 (1979)]、コンピテント法[J. Mol. Biol., 56: 209 (1971)]、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

[0039]

特に、本発明の形質転換体は、本発明のSLDHをコードするDNAを含む発 現ベクターで形質転換された宿主細胞である。該形質転換体がDーソルビトール から2KLGAを製造することを目的として作製される場合、宿主細胞はL-ソ ルボースを2KLGAに変換する能力を有するものである必要がある。好ましく は、該宿主細胞はSDHおよびSNDH活性を産生する細胞である。天然に存在 するこのような細胞としては、例えばグルコノバクター属やアセトバクター属、 シュードグルコノバクター属等に属する細菌、具体的にはグルコノバクター・オ キシダンスT-100(FERM BP-4415;国際出願公開WO95/2 3220号公報)等が挙げられる。また、人工的に作製されたこのような細胞と しては、上記の天然に存在する細菌等から単離されたSDHおよびSNDHをコ ードするDNAを機能的に含む発現ベクターで形質転換された細胞、好ましくは 大腸菌、シュードモナス属細菌、グルコノバクター属細菌、シュードグルコノバ クター属細菌、アセトバクター属細菌等が挙げられる。具体的には、E. coli JM 109-pUC19SD5(国際出願公開WO94/20609号公報),グルコノバクター ・オキシダンス NB6939-pSDH-tufB1, グルコノバクター・オキシダンス NB6939pSDH-trp6.グルコノバクター・オキシダンス NB6939-pSDH-PL1, グルコノバクタ - ・オキシダンス NB6939-pSDH-tac8 (以上、国際出願公開WO95/2322 0号公報)等が例示される。

[0040]

また、本発明の形質転換体は、上記のようにSLDHをコードするDNAに加えて、SDHをコードするDNAおよび/またはSNDHをコードするDNAを、宿主細胞内で発現し得る形態で含有する発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによっても得ることができる。該発現ベクターがSDHをコードするDNAまたはSNDHをコードするDNAのいずれか一方を欠く場合、当該DNAを含む別の発現ベクターとともにコ・トランスフォーメーションすればよい。

[0041]

本発明の組換えSLDHは、上記のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターを含有するいずれかの形質転換体を適当な培地中で培養し、得られる培養物からSLDHを採取することにより製造することができる。

[0042]

用いられる栄養培地としては、炭素源としてグルコース、フルクトースなどの糖類、グリセロール、好ましくはLーソルボース、Dーソルビトールを含有するものである。また無機もしくは有機窒素源(例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、カゼインの加水分解物、酵母抽出物、ポリペプトン、バクトトリプトン、ビーフ抽出物等)を含んでいてもよい。さらに所望により、他の栄養源〔例えば、無機塩(例えば、ニリン酸ナトリウムまたはニリン酸カリウム、リン酸水素ニカリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム)、ビタミン類(例えば、ビタミンB1)、抗生物質(例えば、アンピシリン、カナマイシン)など〕を培地中に添加してもよい。好ましくは、Dーソルビトール、酵母エキス、CaCO3、グリセロールを組成とする培地である。また、培地の糖(Dーソルビトール)の濃度は、通常1~50%、好ましくは2~40%である。

[0043]

形質転換体の培養は、通常 p H 5 . 5 ~ 8 . 5 、好適には p H 6 ~ 8 の条件下、通常 1 8 ~ 4 0 ℃、好適には 2 0 ~ 3 5 ℃で 5 ~ 1 5 0 時間で行われる。

[0044]

SLDHの精製は、SLDH活性の存在する画分に応じて、通常使用される種

々の分離技術を適宜組み合わせることにより行うことができる。本発明のSLD HはNAD(P) + 依存性であることから、通常、形質転換体の可溶性画分に局 在する可能性が高い。その場合、培養終了後に培養物を濾過もしくは遠心分離し て菌体を回収し、超音波処理やリゾチーム処理および浸透圧ショック等によって 細胞を破砕して得られる菌体抽出液を用いる。

[0045]

組換えSLDHが、上述のようにその末端に特定のアミノ酸配列を付加された 形態で産生される場合、該SLDHは、該特定アミノ酸配列を吸着させ得る金属 イオンキレートを固定化した担体を用いたクロマトグラフィー処理(固定化金属 アフィニティークロマトグラフィー;IMAC)により、迅速且つ容易に精製す ることができる。使用される金属イオンキレート吸着体は、遷移金属、例えばコ バルト、銅、ニッケル、鉄の二価イオン、あるいは鉄、アルミニウムの三価イオ ン等、好ましくはコバルトの二価イオン含有溶液を、リガンド、例えばイミノジ 酢酸基、ニトリロトリ酢酸基、トリス(カルボキシメチル)エチレンジアミン基 等を付着したマトリックスと接触させて該リガンドに結合させることにより調製 される。キレート吸着体のマトリックス部は通常の不溶性担体であれば特に限定 されない。

[0046]

本発明のL-ソルボースの製造方法は、上記のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターを含有するいずれかの形質転換体を適当な培地中で培養し、得られる培養物、あるいはSLDH活性が該形質転換体の菌体内画分に存在する場合にはその菌体抽出液にD-ソルビトールを接触させることにより、L-ソルボースを生成させる。培養物にD-ソルビトールを接触させる方法には、D-ソルビトールを含有する培地中で該形質転換体を培養する方法も包含される。

[0047]

本発明はまた、上記方法により取得されたL-ソルボースを利用した2KLGAの製造方法を提供する。すなわち、L-ソルボースを2KLGAに変換し得る宿主細胞、好ましくはSDHをコードするDNAおよびSNDHをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を、適当な培地中で培養し、

得られる培養液、あるいはSDHおよびSNDH活性が該宿主細胞の菌体内画分に存在する場合にはその菌体抽出液に上記方法により取得されたLーソルボースを接触させることにより、2KLGAを生成させる。培養物にLーソルボースを接触させる方法には、Lーソルボースを含有する培地中で該宿主細胞を培養する方法も包含される。

[0048]

本発明の別の2KLGAの製造方法は、上記のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された、Lーソルボースを2KLGAに変換し得る宿主細胞を、適当な培地中で培養し、得られる培養液、あるいはSLDH、SDHおよびSNDH活性が該宿主細胞の菌体内画分に存在する場合にはその菌体抽出液にDーソルビトールを接触させることにより、2KLGAを生成させる。培養物にDーソルビトールを接触させる方法には、Dーソルビトールを含有する培地中で該宿主細胞を培養する方法も包含される。

[0049]

本発明のL-ソルボースの製造方法および2KLGAの製造方法において用いられる培地および培養条件は、上記のSLDHの製造方法において用いられるものと同一であるかもしくは一部が異なるものでよい。

[0050]

また、菌体抽出液にD-ソルビトールまたはL-ソルボースを接触させる場合には、培養終了後の培養物を遠心分離または濾過して菌体を回収し、これを適当な緩衝液、例えば酢酸緩衝液中に懸濁して、超音波処理等により菌体を破砕した後遠心処理して得られる上清を菌体抽出液として使用すればよい。

[0051]

このようにして生産されたL-ソルボースまたは2KLGAは、反応液(D-ソルビトールまたはL-ソルボースを含有する培地中で該形質転換体を培養する場合には培養上清)から一般に用いられる精製方法(例えば、透析,ゲル濾過,適当な吸着材上でのカラムクロマトグラフィー,高速液体クロマトグラフィーなど)を用いて精製することができる。

[0052]

精製された2KLGAは、従来公知の手段により、L-アスコルビン酸またはその塩(例えば、アルカリ金属もしくはアルカリ土類金属との塩)に変換することができる。このような手段は特に限定されないが、例えば、2KLGAに塩酸などの強酸を加えて加熱する方法が挙げられる。

[0053]

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、これらは単なる例示であって、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

[0054]

実施例1 SLDHのクローニング

(1) 染色体DNAの調製

G. オキシダンスG624株 (FERM BP-4415; WO95/232 20号公報)のシングルコロニーを2.5%マンニトール、0.3%ポリペプト ンおよび 0. 5 %酵母エキスからなる培地 (p H 6. 0) で 3 7 ℃、4 8 時間培 養した。菌体を遠心(6,000грm,10分間)により集めて、滅菌水1m 1に懸濁した。懸濁液をSTE緩衝液〔20%スクロース-50mM Tris -HC1 (pH8. 0) -1 mM EDTA] 1 m l で希釈し、リゾチーム 2 m gを加えた後、37℃で30分間放置した。これに、サルコシル溶液〔1%ラウ ロイルサルコシレート-100mM EDTA (pH8.5)] 2.5mlとプ ロテイナーゼK (終濃度100μg/m1)を加え、50℃で2時間放置した。 これにセシウムクロライド5.5gおよび5mg/m1エチジウムブロミド0. 3m1を加え、20℃、50,000rpmで16時間超遠心した。染色体DN Aを含む部分を単離し、TE緩衝液〔10mM Tris-HC1(pH8.0) - 1 mM EDTA] 30 m l で溶解した後、5 L の 1 mM EDTAで2回 透析した。透析液をイソブタノールで4回、フェノールで2回、クロロフォルム で3回洗浄した後、エタノール沈澱により精製した。これをTE緩衝液10ml で溶解し、180μg/mlの染色体DNA溶液を得た。

[0055]

(2) コスミドライブラリーの作製

大腸菌DH1/pcos6EMBL (ATCC 37571;住友ファーマ・ インターナショナル(株)経由でATCCより購入)のシングルコロニーを50 μg/mlカナマイシン含有LB培地〔1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス 、1%塩化ナトリウム(p H 7.4)〕3m1中で37℃、16時間培養した後 、その0.5mlを50μg/m1カナマイシン含有LB培地50mlを入れた 500m1容三角フラスコに植菌した。37℃で8時間培養した後、遠心(6, 000rpm, 10分間) により集菌し、QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN社)でコスミドpcos6EMBLを精製した。pcos6EMBL25μgを5 OUのBamHIで37℃、2時間消化後、エタノール沈澱により精製した。こ れを3Uの仔ウシ小腸由来アルカリフォスファターゼ(CIAP)で37℃、1 時間脱リン酸処理し、エタノール沈澱により精製した。一方、上記(1)で得ら れたG. オキシダンスG624株の染色体DNA100μgを5 UのSau3A Ⅰで37℃、1分間部分消化後、エタノール沈澱により精製した。該部分消化物 約1.5μgとpcos6EMBLのBamHI消化物約3μgを、3UのT4 DNAリガーゼで4℃、16時間ライゲーションした。このうち3μ1をGIGAPA CK II Gold Packaging Extract (STRATAGEN 社) でインビトロパッケージングし た。このパッケージング液をSMバッファー〔50mM Tris-HCl(p H7. 5) $-100 \,\mathrm{mM}$ NaCl $-8 \,\mathrm{mM}$ MgSO₄ -0. 1% t = 7.5で50倍希釈し、その25μ1で指示菌(大腸菌XL1-Blue MRA) 2 5μ1を感染させた後、50μg/m1カナマイシン含有LΒプレートに播き、 37℃で1晩放置した。約400個のコロニーが得られたので、約40万クロー ンのコスミドライブラリーが得られたことになる。

[0056]

(3) SLDH活性を有するクローンのスクリーニング

5%ソルビトールおよび50μg/m1カナマイシンを含有する0.9倍希釈 LB培地を1ウェルあたり150μ1入れた96ウェルプレート丸底(ナルジェ社)で、368個のコスミドクローンを30℃、3日間ゆるやかに振盪培養した。遠心(2,000rpm,10分間)後、培養上清20μ1に0.5mg/m1レゾルシン-エタノール溶液30μ1と0.216mg/m1硫酸鉄(III)ア

[0057]

(4) シャロミドベクターへのサブクローニング (インサートの縮小化)

SLDH活性を有する300ngのコスミドクローン1A4を、20mUのS au3AIで37℃、1 時間部分消化した。また、シャロミド9-28(ニッポ ンジーン社) 1 μgを4 UのBamHIで37℃、1 時間消化した。この2つの 溶液を混合後、エタノール沈澱により精製し、2倍希釈したTE緩衝液5μ1で 溶解したものを、1UのT4DNAリガーゼで4℃、16時間ライゲーションし た。このうち1μ1をGIGAPACK II XL Packaging Extract (STRATAGEN 社) でイ ンビトロパッケージングした。このパッケージング液75μ1とSMバッファー **75μ1を混合し、これで指示菌(大腸菌DH−1)150μ1を感染させた後** 、50μg/m1アンピシリン含有LBプレートに播き、37℃で1日インキュ ベートした。出現したコロニーのうち95個を、5%ソルビトールおよび50μ g/m1カナマイシンを含有する0.9倍希釈LB培地を1ウェルあたり150 µ1入れた96ウェルプレート丸底(ナルジェ社)で、30℃、3日間ゆるやか に振盪培養した。遠心 (2,000rpm,10分間)後、培養上清20µ1に 5 mg/m1レゾルシンーエタノール溶液30μ1と0.216mg/m1 硫酸鉄(III) アンモニウムー塩酸溶液30μ1を加えた後、80℃で1時間加熱 した。培地のみを同様に反応させたものをコントロールとし、コントロールより 強く褐色を呈したG1、C2、A4、B7、H10、B12の6クローンをソル ボースへの変換能を有するクローンとした。これらのシャロミドクローンのイン サート部分の長さはいずれも約15kbであった。

[0058]

(5) SLDH遺伝子のプラスミドベクターへのサブクローニング

これまでに得られたクローンの制限酵素地図から、SLDH遺伝子にはSac Ι部位およびΧ b a I 部位が存在しないことがわかった。そこで、1 μ g のシャ ロミドB7を10UのSacIおよび10UのXbaIで消化し、約6kb(B 7SX3)と約9kb(B7SX2)のSacI-XbaI断片を得た。この2 つの断片をそれぞれ大腸菌ーシュードモナスシャトルベクターpUCP19 [p UC19のNarI部位に、pRO1614由来の1. 8kbのPstI断片が 挿入されており、大腸菌DH5αF'(ATCC 87110)から精製した] に連結した後、シュードモナス(Pseudomonas)(その後、本菌株はシュードモ ナス sp. F-1と命名された。以下、本命名を用いる。) をエレクトロポー レーション法にて形質転換し、Ps. /pUCP19-B7SX3とPs. /p UCP19-B7SX2を得た。コンピテント細胞の調製および形質転換の条件 は大腸菌のそれに準じて行った。この2クローンをソルビトールを含む培地で培 養したところ、 Ps. / pUCP19-B7SX2にソルボースへの変換能が認 められた。そこで、Ps. /pUCP19-B7SX2を、5%ソルビトール、 1%バクトトリプトン、Ο. 5%酵母エキス、1%塩化ナトリウム、50μg/ m 1 アンピシリンからなる培地 (p H 7.4) で30℃、4日間培養したところ 、 2. 4 m g / m l のソルボースが得られた(変換率 5 %)。このソルボースを HPLCで分取し、標品との保持時間の一致を確認した。HPLCは上記(3) と同様の条件にて行った。さらに、GC/MS〔カラム:DB-5(J & W Scie ntific) , 0. 32mm×30m (film0. 25μm) ;温度% インジェク ション=230℃, カラム=100℃ (5分) →10℃/分で10分間加温→2 00℃ (5分) →30℃/分で1分間加温→230℃ (4分), 検出=230℃ ;流量:圧力制御20kPa(He)]を用いて、標品とのマスパターンの一致 を確認した。

[0059]

(6) SLDH遺伝子の塩基配列決定

SLDH活性を発現するシュードモナスの形質転換株Ps. / PUCP19-B7SX2のプラスミドPUCP19-B7SX2のインサート部分の制限酵素地図は図2のように推定された。1μgのPUCP19-B7SX2を10UのHind IIIで37℃、1時間消化して、約4kbのHind IIIーHind III断片を得た。このHind IIIーHind III断片をべクターPUCP19に連結し、プラスミドPUCP19ーHCを構築した。そして、このプラスミドでシュードモナスを形質転換し、Ps. / PUCP19ーHCを得た。この形質転換株をソルビトールを含む培地で培養したところ、SLDH活性の発現が認められたので、このHind IIIーHind III断片にSLDH遺伝子の全長が含まれていることがわかった。従って、この約4kbのHind IIIーHind III 断片の塩基配列を決定することにした。まず、PUCP19ーHCのインサート部分を約1.1kbのSphIーSphI断片(S1)、約0.8kbのEcoRIーSphI断片(ES)および約1.3kbのEcoRIーEcoRI(E1)断片の3つに分け(図2)、それぞれPUC18にサブクローニングし、PUC18-S1、PUC18-ESおよびPUC18-E1を得た。

[0060]

プラスミドpUCP19-HC、pUC18-S1、pUC18-ESおよびpUC18-E1をテンプレートにして、M13シークエンシングプライマーであるユニバーサルプライマーおよびリバースプライマー(New England Labs.)を用いて最初のシークエンシングを行った。なお、サンプルはBigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems社)で蛍光標識し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社)で分析した。次に、下に示した11種類のプライマーを合成し、pUCP19-HCをテンプレートにしてシークエンシングを行い、約4kbのHind III-Hind III断片の塩基配列を決定した(配列表配列番号2)。

[0061]

SLDH遺伝子シークエンス用プライマー

SL1 GCTGCTGAGTGATCCG (配列表配列番号3)

SL2 GACTGCTACTTCGATCC (配列表配列番号4)

特平11-22467

S L 3	CCTACACCTAGCCTGC	(配列表配列番号5)
S L 4	CAGTGCCGTCATGAGG	(配列表配列番号6)
SL5	TCCTGATCTCGGTGCG	(配列表配列番号7)
SL6	GATGCTTCAGCACGGC	(配列表配列番号8)
S L 7	GACGATCACGGAAGGC	(配列表配列番号9)
SL8	GGTTACGTGGTCGAGG	(配列表配列番号10)
SL9	CTATACGTGACAGGTCC	(配列表配列番号11)
S L 1 0	GCGCGATCTGGATACG	(配列表配列番号12)
S L 1 1	CGAGGATCTCGAACGG	(配列表配列番号13)

[0062]

塩基配列の解析から、1455bpのORFが見出された(塩基番号537~1991)。したがって、SLDHは485アミノ酸からなり、分子量は約54kDaであると推定された。また、ホモロジー検索の結果、シュードモナス・フルオレセンスのマンニトールデヒドロゲナーゼと42%のホモロジーがあることがわかった。

[0063]

実施例2 組換えSLDHの製造

(1) ヒスチジンーTagを有するSLDH(以下、His-tagged SLDH という)を発現するプラスミドの構築

組換え蛋白質を精製するのに、 $6 \times \text{LZ}$ チジンを利用したTag システムは非常に簡便な方法である。すなわち、6 つのLZ チジンTag を持つ蛋白質を発現させ、コバルトやニッケルなどの金属とLZ チジン残基との相互作用を利用して、IMAC により該蛋白質を分離するというものである。まず、SLDHoC 末端側に $6 \times \text{His}$ を挿入するために、以下に示す 2 対のプライマーをそれぞれ用い、pUCP19-HC (5 ng) をテンプレートにして、pfu DNAポリメラーゼ (2.5 U) でPCR を行った (94 C, $30 \text{N} \rightarrow 55 \text{C}$, $2 \text{O} \rightarrow 72 \text{C}$, 2 O, 25 H イクル)。なお、プライマー(620 pmo1)は99 CC で 分間加熱後、急冷したものを用いた。

[0064]

PCR1

プライマー1 (センス) [SLDHコーディング配列内のNhe I 部位 (下線部) 付近の配列と一致する配列]

CGGATTGCTAGCGATGGC

(配列表配列番号14)

プライマー2(アンチセンス) [SLDHコーディング配列の3'末端と一致する配列、6×His(H)、終止コドン(*)およびBamHI部位(下線部)を含む]

ATCGAGGATCC TCA ATGATGATGATGATGATG GGCCGGGATGGCGGC

* H H H H H (配列表配列番号15)

PCR2

プライマー3 (センス) [BamHI部位(下線部)およびSLDH遺伝子の終止コドンの直後の配列と一致する配列を含む]

ATCGAGGATCCATTCGGCTTTTAGGGTAGC (配列表配列番号16)

プライマー4(アンチセンス) [SLDH遺伝子の3'非コーディング領域内の BglII部位付近の配列と一致する配列およびSacI部位(下線部)を含む]

TAGCTGAGCTCATGGGACAGATCTGAGC

(配列表配列番号17)

[0065]

PCR1で特異的に増幅した約360bpの断片をNheIおよびBamHIで消化し、また、PCR2で特異的に増幅した約100bpの断片をBamHIおよびSacIで消化した。これとは別に、pUCP19-HCをBglIIおよびPstIで消化して得られる約2kbの断片を、pUCP19のBamHI-PstI断片に挿入してインサートのBglII部位より下流を除いたプラスミドpUCP19-SLDHを得た(図3)。これをNheIとSacIで消化し、得られる約6.2kbの断片を、上記2つのPCR増幅断片とT4DNAリガーゼで連結し、pUCP19-SLDH-Hisを構築した。このプラスミドでシュードモナスを形質転換し、Ps./pUCP19-SLDH-Hisを得た。

[0066]

(2) His-tagged SLDH の精製

形質転換株Ps. / pUCP19-SLDH-Hisの凍結保存菌体の1 白金

耳を、50μg/mlアンピシリンを含むLB培地2mlを入れた15ml容遠 心チューブ(コーニング社)に植菌し、30℃で16時間培養した。その1.5 m 1 を 5 %ソルビトールと 5 0 μ g / m 1 アンピシリンを含む L B 培地 5 0 m 1 を入れた500m1容三角フラスコに植菌し、25℃で3日間培養した。遠心(6,000rpm、4℃、5分間)により集菌した後、100mM NaCl含 有20mM Tris-HC1(pH8.0)10mlで懸濁した。該懸濁液を 超音波破砕装置(トミー社UD-201型)で5分間(50%インターバル)処 理し、遠心(15,000rpm、4℃、10分間)した後、上清を回収し無細 胞抽出液とした。2m1のTARON樹脂(CLONTECH社)を15m1容遠心チュ ーブ (コーニング社) に入れ、100mM NaCl含有20mM Trisー HC1 (pH8. 0) 10m1で2 回洗浄して平衡化した。そして、5m1の上 記無細胞抽出液を加え、室温で20分間振盪することでHis-tagged SLDH を吸着 させた後、100mM NaCl含有20mM Tris-HCl (pH8.0)10m1で3回、10分かけて洗浄した。次に、10mM、30mM、50m Mおよび100mMイミダゾールをそれぞれ含有する100mM NaCl含有 20mM Tris-HC1 (pH8.0) 2mlを順次加え、それぞれ室温で 2分間振盪してHis-tagged SLDH を溶出した。その結果、30mM~50mMイ ミダゾール画分にSLDH活性が溶出した。該画分をSDS-PAGE分析した ところ、ほぼ単一のバンドが検出された。

[0067]

(3) N末端アミノ酸配列分析

上記(2)で精製したHis-tagged SLDH を、ゲル濃度12.5%のマルチゲル (第一化学薬品製)を用い、40mAの電流で1時間電気泳動した後、ホライズ ブロット (アトー社)を用いて、PVDF膜 (イモビロンPSQ;ミリポア社) に転写した。膜をクマシーブリリアントブルーG-250で染色した後、約55kDaのSLDHと思われるバンドをハサミで切り出した。このPVDF膜をプロテインシークエンサーG100A (ヒューレットパッカード社)とPTHアナライザー1090型 (ヒューレットパッカード社)でアミノ酸配列分析したところ、SLDH遺伝子のORFから予想されるN末端アミノ酸配列と一致する配列

(MITRETLKSL;配列表配列番号18)が得られた。

[0068]

(4) SLDH活性の確認

アプライする無細胞抽出液を10m1とすること、His-tagged SLDH 吸着後の樹脂の洗浄を6回行うこと、並びに50mMイミダゾールおよび100mM N a C 1含有20mM T r i s - H C 1 (p H 8. 0) 5m1 でHis-tagged SLDH を溶出させること以外は、上記(2)と同様にしてHis-tagged SLDH を精製した。次いで、得られたHis-tagged SLDH をソルビトールと反応させた時の生成物を分析した。反応液(2m1)組成は、10mM(1.82mg/m1)ソルビトール、0.1M グリシン/NaOH 緩衝液(p H 10.1)、5mM NAD P + およびHis-tagged SLDH 0.2m1(41.4μ g蛋白)とし、25℃で24時間反応させた。その結果、1.12mg/m1のソルボースが生成した(ソルビトールは0.70mg/m1残存していた;変換率62%)。したがって、コバルトタイプの1MACで精製したHis-tagged SLDH は、ソルビトールを酸化してソルボースを生成するソルビトール脱水素酵素であることが確認された。

[0069]

実施例3 SLDHの特性解析

(1) 補酵素要求性および作用 p H範囲

 D^+ および $NADP^+$ のいずれも補酵素として利用できるが、 $NADP^+$ の方が特異性が高かった。また、該酵素の活性はアルカリ性のPHにおいてより高かった(表1)。

[0070]

【表1】

補酵素	рН	活性 (U/mg 蛋白)
NADP*	10. 1	130. 2
	9. 0	30.0
	8. 0	22. 9
	7. 0	4. 2
NAD⁺ .	10. 1	8. 1
	9. 0	3. 4
	8. 0	1. 2
	7. 0	0. 1

[0071]

(2)基質特異性

上記(1)の反応液において、ソルビトールを各種基質で置き換え、また緩衝液をグリシン/NaOH緩衝液(pH10.1)、補酵素をNADP せする以外は全く同様にして、SLDH活性を測定した。その結果、本酵素はソルビトールの他、マンニトール、アラビトールを基質として利用できるが、キシリトール、リビトール、イノシトールおよびグリセロールには作用しなかった(表 2)。

[0072]

【表2】

基質	活性(U/mg 蛋白)
ソルビトール	130. 2
マンニトール	85. 7
アラビトール	88. 1
キシリトール	0
リビトール	0
イノシトール	0
グリセロール	0

[0073]

(3) ミカエリス定数

ソルビトールを基質として、上記(2)の方法に従ってSLDH活性を測定したところ、ソルビトールに対するKm 値は132mM(25%)であった。

[0074]

実施例4 SNDH/SDH発現ベクターを有するシュードモナス形質転換株の作製および該形質転換株による2KLGA生産性の検討

ルイジアナ州立大学メディカルセンターのKovach博士から供与された広域プラスミドであるpBBR系プラスミド [Gene, 166, 175 (1995)] のうち、pBBR1MCS-2 (カナマイシン耐性) およびpBBR1MCS-3 (テトラサイクリン耐性) をベクターとして用いて、シュードモナス属株にSNDH/SDH遺伝子を導入し、得られた形質転換体によるL-ソルボースからの2KLGAの発酵生産について検討した。

(1) SNDH/SDH発現広域プラスミドの構築

tufBをプロモーターとするSNDH/SDH遺伝子を含むプラスミドpSDH-tufB1-Eco-d9U(図4)5 µgをEcoRI(ベーリンガー・マンハイム社)50Uで37℃、1時間消化し、0.8%アガロースゲルで電気泳動した後、SNDH/SDH遺伝子を含む3.7kbのEcoRI/EcoRI断片を分取した。この断片をpBBR1MCS-2のEcoRI部位に挿入

した。そのうち、 β ーガラクトシダーゼ遺伝子と同じ方向に挿入されたプラスミドを β BBR (Km) - SDH・SNDHとした(図5)。

また、tufBをプロモーターとするSNDH/SDH遺伝子を含むプラスミドpSDH-tufB1 (構築方法はEP 0758679 A1 に記載) 10μg をEcoRI (ベーリンガー・マンハイム社) 50Uで37℃、1時間消化した後、クレノウフラグメント (ニッポンジーン社) を用いて室温で30分間処理して末端を平滑化した。T4DNAリガーゼ (TOYOBO社) を用いて該末端にPstIリンカー (GCTGCAGC, TOYOBO社) を連結した後、PstI (ベーリンガー・マンハイム社) 50Uで37℃、1時間消化した。該消化物を0.8%アガロースゲルで電気泳動して、SNDH/SDH遺伝子を含む3.7kbのPstI/PstI断片を分取した。この断片をpBBR1MCS-3のPstI部位に挿入した。そのうち、βーガラクトシダーゼ遺伝子と同じ方向に挿入されたプラスミドをpBBR (Tc) SDH・SNDHとした(図6)。

[0075]

(2) シュードモナスのコンピテント細胞の調製

シュードモナス sp. F-1のグリセロール凍結保存菌体を、1%バクトトリプトン (Difco社)、0.5%酵母エキス (Difco社)、1%塩化ナトリウムからなるL培地 (pH7.4)3mlを含む16.5×165mm試験管に接種し、30℃で一晩培養した。その培養液全量をL培地50mlを含む50ml容三角フラスコに接種し、25℃で6時間培養した。培養液を遠心して集菌した後、冷却した10%グリセロール水溶液30mlで2回洗浄した。洗浄菌体を少量の冷却した10%グリセロール水溶液で懸濁し、60μlずつ分注した後、液体窒素で瞬間凍結した。

[0076]

(3)シュードモナスの形質転換

液体窒素中で凍結保存されたシュードモナス sp. F-1のコンピテント細胞を氷水中で解凍した後、上記(1)で構築したSNDH/SDH発現広域プラスミド、PBBR (Km) $-SDH \cdot SNDH$ および PBBR (Tc) $-SDH \cdot SNDH$ の溶液それぞれ $1 \mu 1$ (約 $1 \mu g$) を加え、 $4 \nabla \sigma 3$ 0 分間保持した

。これをジーンパルサー遺伝子導入装置(バイオラッド社)を用い、電極間距離が0.1 c mのキュベット中、200Ω、1.8 k V、25 μ Fの条件でトランスフォームした後、0.4%グルコースを含むL培地に懸濁し、30℃で1時間振盪した。50 μ g / m l カナマイシンを含むL寒天プレートおよび20 μ g / m l テトラサイクリンを含むL寒天プレートにそれぞれ播き、30℃で2日間培養して、形質転換株 P s. / p B B R (K m) - S D H・S N D H および P s. / p B B R (T c) - S D H・S N D H を取得した。

[0077]

(4) 形質転換株によるソルボースからの2KLGAの発酵生産

上記(3)で得られた形質転換株 Ps. / pBBR(Km) - SDH・SND Hおよび Ps. / pBBR(Tc) - SDH・SNDHのシングルコロニーを、5m1のL培地を含む16.5×165mm試験管にそれぞれ接種し、30℃で2日間培養した。その培養液0.5m1を、5%ソルボース、0.1%グルコース、0.9%バクトトリプトン(Difco社)、0.45%酵母エキス(Difco社)、0.9%塩化ナトリウム、2%炭酸カルシウムからなる2KLGA生産用培地(pH7.4)10m1を含む100m1容三角フラスコに接種し、30℃で5日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清中のソルボース、ソルボソン、2KLGAおよびL-イドン酸を定量した。ソルボース、ソルボソン、2KLGAおよびL-イドン酸はそれぞれ以下の条件でHPLCにより定量した

「ソルボース]

カラム: Polyspher OA KC (7.8mm内径×300mm; Cica-MERCK)

移動相: 0. 01N H₂ SO₄

カラム温度:室温

流速: 0. 4 m l / 分

検出:示差屈折計

「ソルボソン(ポストカラムラベリング法)]

カラム: Polyspher OA KC(7.8mm内径×300mm;

Cica-MERCK)

移動相 (ラベル化剤): 0.04 M塩酸ベンズアミジン

0. 25M亜硫酸カリウム

2 mMホウ酸/0. 1 N水酸化カリウム

流速: 0. 3 m 1 / 分

検出:蛍光検知器(励起波長:315nm,検出波長405nm)

[2KLGAおよびL-イドン酸]

カラム: Capcell pak NH2 (4.6mm内径×250mm; 資生堂)

移動相:30%アセトニトリル,20mMリン酸カルシウム(pH3.0)

流速:1.2ml/分

検出:UV-210nm

その結果、Ps. /pBBR (Km) $-SDH \cdot SNDH のソルボースから 2 KLGAへの変換率は約 18%、<math>L-$ イドン酸への変換率を合わせると約 3 7% であった。また、Ps. /pBBR (Tc) $-SDH \cdot SNDH のソルボースから 2 KLGAへの変換率は約 2 6%、<math>L-$ イドン酸への変換率を合わせると約 4 7%であった(表 3)。

[0078]

【表3】

形質転換株の培養結果 (mg/ml)

形質転換株	ソルボース	ソルボソン	2KLGA	L-イドン酸
Ps. /pBBR (Km) -SDH - SNDH	12. 5 (25. 0)	0. 3 (0. 6)	8. 9 (17. 8)	9.6 (19.6)
Ps. /pBBR (Tc)-SDH-SNDH	15. 6 (31. 2)	0. 15 (0. 3)	13 (26. 0)	10. 3 (20. 6)
Ps. / pBBR (1c) - SDH・SNDH				

[0079]

比較のために、非形質転換株シュードモナス sp. F-1の2KLGAおよびL-イドン酸生産についても調べた。シュードモナス sp. F-1のグリセロール凍結保存菌体を、5m1のL培地を含む16. 5×165 mm試験管に接種し、30で1日間培養した。その培養被1m1を5%ソルボース、<math>0. 9%

バクトトリプトン (Difco社)、0.45%酵母エキス (Difco社)、0.9%塩化ナトリウムからなる培地 (pH7.4) 10mlを含む100ml 容三角フラスコに接種し、30℃で3日間培養した。培養液を遠心分離し、同様に培養上清中のソルボース、ソルボソン、2KLGAおよびLーイドン酸を定量した。その結果、ソルボースは5.7mg/mlと消費されていたが、ソルボソン、2KLGAおよびLーイドン酸は検出されなかった。

以上より、2 K L G A および L - 4 ドン酸非生産性のシュードモナス sp. F-1 に S N D H / S D H 遺伝子を導入することにより、ソルボースから <math>2 K L G A および L - 4 ドン酸を 高生産する形質転換株を得ることができた。

[0080]

実施例5 SNDH/SDH発現ベクターを有するシュードモナス形質転換株の 作製および該形質転換株による2KLGA生産性の検討(2)

実施例4と同様にして、シュードモナス属に属する別の菌株(シュードモナス IFO3309株; (財)発酵研究所(大阪市淀川区十三本町2-17-85) より分与を受けた)を宿主として、SNDH/SDH遺伝子を導入した形質転換株を作製し、該形質転換株における2KLGAおよびL-イドン酸生産性を調べた。

(1)シュードモナスIFO3309株へのSNDH/SDH遺伝子の導入シュードモナスIFO3309株のグリセロール凍結保存菌体を、実施例4の(2)と同様の方法で処理し、コンピテント細胞の凍結保存菌体を調製した。液体窒素中で凍結保存された該コンピテント細胞を氷水中で解凍した後、SNDH/SDH発現広域プラスミドであるPs./pBBR(Km)-SDH・SNDHの溶液1μl(約1μg)を加え、4℃で30分間保持した。これをジーンパルサー遺伝子導入装置(バイオラッド社)を用い、実施例4の(3)と同様の条件で形質転換して、形質転換株Ps.IFO3309/pBBR(Km)-SDH・SNDHを取得した。

[0081]

(2) 形質転換株における2KLGAの発酵生産

上記(1)で得られたPs. IFO3309/pBBR(Km)-SDH·S

NDHの1白金耳を、2%ソルビトール、0.5%酵母エキス(Difco社)からなる培地(pH7.0)5mlを含む16.5×165mm試験管に接種し、28℃で1日間培養した。その培養液1mlを5%ソルビトール、0.5%酵母エキス(Difco社)、0.2%ポリペプトン(和光純薬)、0.1%K2HPO4、0.5%MgSO4・7H2O、2%CaCO3からなる培地ベpH7.0)10mlを含む100ml容三角フラスコに接種し、28℃で7日間培養した。培養液を遠心分離し、実施例4の(4)と同様にして培養上清中のソルビトール、ソルボース、ソルボソン、2KLGAおよびLーイドン酸を定量した。比較のために、非形質転換株シュードモナスIFO33O9株を同じ条件で培養し、培養上清中のソルビトール、ソルボース、ソルボソン、2KLGAおよびLーイドン酸を定量した。

その結果、非形質転換株では、ソルビトールは 0.4 mg/mlと消費され、ソルボースは 3.9 mg/mlと生産していたが、ソルボソン、2KLGAおよびLーイドン酸は検出されなかった。一方、形質転換株Ps.IFO3309/pBBR(Km)ーSDH・SNDHでは、1.2 mg/mlの2KLGAと、0.5 mg/mlのLーイドン酸を生産していた(表4)。すなわち、シュードモナスIFO3309が2KLGAおよびLーイドン酸を生産できない条件下でも、SNDH/SDH遺伝子を該宿主に導入することにより、ソルビトールから2KLGAおよびLーイドン酸を生産する能力が付与されることが確認された。

[0082]

【表4】

形質転換株の培養結果 (mg/ml)

形質転換株	ソルボース	ソルボソン	2KLGA	L-イドン酸
Ps. 3309/pBBR (Km) -SDH · SNDH	0. 41	1. 8	1.2	0. 5 🔅

[0083]

実施例6 SLDH発現ベクターおよびSNDH/SDH発現ベクターを導入したシュードモナス形質転換株による2KLGAの製造

(1) SLDH発現ベクターおよびSNDH/SDH発現ベクターを有するシュ

ードモナス形質転換株の作製

上述のように、pBBR1MCS-2にG. オキシダンスT-100 (FERM BP-4188; EP 0758679 A1) 由来のSNDH/SDH遺伝子を組み込んだ発現ベクターpBBR (Km) - SDH・SNDH (図5) を構築した。実施例1の(5)で得られた組換えシュードモナスPs. / pUCP19-B7SX2に、pBBR (Km) - SDH・SNDHをエレクトロポーレーション法を用いて導入し、Ps. / pUCP19-B7SX2+pBBR (Km) - SDH・SNDHを得た。

[0084]

(2) シュードモナス形質転換株による2KLGAの生産

Ps. /pUCP19-B7SX2+pBBR(Km)-SDH・SNDHを、5%ソルビトール、1%バクトトリプトン(Difco 社)、0.5%酵母エキス(Difco 社)、1%塩化ナトリウム、50μg/m1アンピシリン、50μg/m1カナマイシン、2%軽質炭酸カルシウムからなる培地(pH7.4)で30℃、4日間培養したところ、1.1mg/m1の2KLGAと1.7mg/m1のイドン酸が得られた。2KLGAについては、HPLCで分取し、標品との保持時間の一致を確認した。さらに、GC/MSを用いて、標品とのマスパターンの一致を確認した。HPLCおよびGC/MSはそれぞれ実施例1の(3)および(5)と同様の条件で行った。

[0085]

実施例7 種々のシュードモナス形質転換株の作製

(1) Ps. /pUCP19-SLDH+pBBR (Km) -SDH・SNDH 実施例2の(1)で構築したpUCP19-SLDHでシュードモナス sp. F-1を形質転換してPs. /pUCP19-SLDHを得た。該組換えシュードモナスにさらにpBBR (Km) -SDH・SNDHを導入して、Ps. /pUCP19-SLDH+pBBR (Km) -SDH・SNDHを得た。

[0086]

(2) Ps. /pUCP19-SLDH-tufB+pBBR (Km) -SDH
· SNDH

SLDH遺伝子の開始コドンの上流にSspI部位を導入するために、pUCP19-SLDH($5\mu g$)をテンプレートとして、下記プライマー(各20pmo1)存在下で、pfu DNAポリメラーゼ(2.5U)を用いてPCRを行った($94 \, \mathbb{C}$, $30 \, \emptyset \rightarrow 55 \, \mathbb{C}$, $2 \, \emptyset \rightarrow 72 \, \mathbb{C}$, $2 \, \emptyset$, $25 \, \emptyset \rightarrow 70 \, \mathbb{C}$

[0087]

センスプライマー [SspI部位(下線部)およびSLDHコーディング配列の5'末端と一致する配列を含む]

TAGGAATATTTCTCATGATTACGCGCGAAACCC

(配列表配列番号19)

アンチセンスプライマー [SLDHコーディング配列内のEagI部位の下流の配列と一致する配列]

GATGCTTCAGCACGGC

(配列表配列番号20)

[0088]

PCRで特異的に増幅した約360bpの断片をSspIとEagIで消化した。また、pUCP19-SLDHをPstIとEagIで消化し、約5.7kbの断片を得た。これら2つの断片とtufBプロモーターを含むPstI-SspI断片(配列表配列番号21)をT4DNAリガーゼで連結し、pUCP19-SLDH-tufBを構築した。そして、このプラスミドでシュードモナスを形質転換し、Ps./pUCP19-SLDH-tufBを得た。さらに、SNDH/SDH活性を発現するpBBR(Km)-SDH・SNDHを導入し、Ps./pUCP19-SLDH-tufB+pBBR(Km)-SDH・SNDHを得入し、DHを得た。

[0089]

(3) Ps. /pUCP19-3DH

5μgのpUCP19-SLDH-tufBを40UのKpnIと40UのPstIで37℃、1時間消化し、1.6kb断片を得た。また、1μgのpUCP19-SDH・SNDH (pUCP19にG.オキシダンスT-100由来のSNDH/SDH遺伝子を組み込んだ発現ベクター;図7)を10UのKpnIと10UのPstIで37℃、1時間消化し、8.2kbの断片を得た。これら2つの断片をT4DNAリガーゼで連結し、pUCP19-3DHを構築した。

そして、このプラスミドでシュードモナスを形質転換し、Ps. /pUCP19-3DHを得た。

[0090]

実施例8 2KLGAの生産性の検討

組換えシュードモナスによる2KLGAの生産が確認できたので、実施例6および7で得られた4種の形質転換株を用いて、種々の組成の培地での2KLGAの生産性を検討した。

[培養1]

1%バクトトリプトン (Difco 社)、 0.5%酵母エキス (Difco 社)、 1% NaCl、 50μ g/mlアンピシリン、 50μ g/mlカナマイシンからなる 培地 (pH7.4) 2m1を含む15m1容チューブ (ファルコン社)に、 Ps./pUCP19-B7SX2+pBBR (Km)-SDH・SNDHの凍結保 存菌体の1白金耳を植菌し、30%で24時間前培養した。前培養液0.5m1を、5%ソルビトール、5%酵母エキス (Difco 社)、 0.15% MgSO4・ $7H_2$ O、 50μ g/mlアンピシリン、 50μ g/mlカナマイシン、4% 炭酸カルシウムからなる本培養培地 (pH7.0) 10m1を含む100m1容 三角フラスコに植菌し、30%で3日間培養した。

「培養2]

本培養培地の5%酵母エキスを5%カザミノ酸に変えた以外は、[培養1]と 同様にして培養した。

[培養3]

本培養培地に1%グリセロールをさらに添加した以外は、 [培養1] と同様に して培養した。

[培養4]

生産菌としてPs. /pUCP19-SLDH+pBBR(Km)-SDH・SNDHを用い、本培養培地に5%グリセロールをさらに添加した以外は、[培養1]と同様にして培養した。

「培養 5]

生産菌としてPs. /pUCP19-SLDH-tufB+pBBR (Km)

- SDH・SNDHを用い、本培養培地に5%グリセロールを添加した以外は、 [培養1] と同様にして培養した。

[培養6]

生産菌としてPs./pUCP19-3DHを用い、前培養培地と本培養培地 からカナマイシンを除き、さらに本培養培地に5%グリセロールを添加した以外 は、[培養1]と同様にして培養した。

各培養におけるソルビトール、ソルボース、ソルボソンおよび2KLGAを定量した。その結果を表5に示す。培地にグリセロールを添加することにより2KLGAへの変換率が向上する傾向が認められた。

[培養7]

本培養培地の酵母エキス濃度を2%とし、さらに5%グリセロールを添加した以外は、[培養1]と同様の条件で、7日間培養した。培養1,3,5および7日目におけるソルビトール、ソルボース、ソルボソンおよび2KLGAを定量した。結果を表5に示す。

[0091]

【表5】

	培養	ソルビトール	ソルボース	ソルボソン	2KLGA	イドン酸	
Г	1	44. 1	6. 3	0. 1	3. 7	1. 6	
	2	44. 8	3. 1	0	4. 8	2. 2	
	3	26. 7	5. 1	0	10.9	8. 4	
	4	26. 6	0	0	9. 0	ND	
	5	26.6	0	0	10.7	ND	
	6	30. 7	5. 2	0	7. 5	ND	
	日数	ソルビトール	ソルボース	ソルボソン	2KLGA	イドン酸	
	1	41.1	0	0	4. 2	ND	
7	3	25. 6	0	0	10.6	ND	
1	5	14. 2 0		0	16.3	ND	
	7	7. 6	0	0	18.4	15. 5	

(単位:mg/ml) ND:定量していない

[0092]

実施例9 SLDH発現ベクターおよび/またはSNDH/SDH発現ベクター を導入したシュードモナス・プチーダ形質転換株によるソルボースまたは2KL

GAの発酵生産

以下の実験において、シュードモナス・プチーダIFO3738株のコンピテント細胞の調製および形質転換は、上記シュードモナス sp.F-1と同様にして行った。但し、シュードモナス・プチーダIFO3738株はアンピシリン耐性のため、選択マーカーとしてアンピシリン耐性を用いる場合には、エレクトロポレーション後、500μg/m1アンピシリン(通常の10倍量)を含むL寒天プレートに細胞を播き、30℃で1日培養して、コロニーの大きいものをピックアップすることにより、形質転換体を選択した。

[0093]

(1) SLDH発現ベクターを導入した形質転換株によるソルビトールからのソ ルボースの発酵生産

シュードモナス・プチーダ I FO3738株にSLDH遺伝子(pUCP19-SLDH)を導入した。得られた形質転換株シュードモナス・プチーダ I FO3738/pUCP19-SLDHのシングルコロニーを、5%ソルビトール、0.9%バクトトリプトン(Difco社)、0.45%酵母エキス(Difco社)、0.9%塩化ナトリウムおよび500μg/m1アンピシリンからなるソルボース生産用培地(pH7.4)10m1を含む100m1容三角フラスコに接種し、30℃で3日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清中のソルビトールおよびソルボースを定量した。その結果、34.6mg/m1のソルビトールが残存し、7.6mg/m1のソルボースが生成した。

[0094]

(2) SNDH/SDH発現ベクターを導入した形質転換株によるソルボースからの2KLGAの発酵生産

シュードモナス・プチーダ I FO 3 7 3 8 に S N D H / S D H 遺伝子 (p B B R (Km) - S D H・S N D H) を導入した。得られた形質転換株シュードモナス・プチーダ I FO 3 7 3 8 / p B B R (Km) - S D H・S N D H のシングルコロニーを、5%ソルボース、0.9%バクトトリプトン (D i f c o 社)、0.45%酵母エキス (D i f c o 社)、0.9%塩化ナトリウム、2%炭酸カルシウムおよび50μg/m l カナマイシンからなる2 K L G A 生産用培地 (p H

7. 4) 10mlを含む100ml容三角フラスコに接種し、30℃で7日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清中のソルボース、2KLGAおよびイドン酸を定量した。その結果、34.3mg/mlのソルボースが残存し、13.9mg/mlの2KLGAおよび3.5mg/mlのイドン酸が生成した。

[0095]

(3) SLDH発現ベクターおよびSNDH/SDH発現ベクターを導入した形質転換株によるソルビトールからの2KLGAの発酵生産

シュードモナス・プチーダIFO3738株にSLDHおよびSNDH/SDH遺伝子(pUCP19-SLDHおよびpBBR(Km)-SDH・SNDH)を導入した。得られた形質転換株シュードモナス・プチーダIFO3738/pUCP19-SLDH+pBBR(Km)-SDH・SNDHのシングルコロニーを、5%ソルビトール、0.9%バクトトリプトン(Difco社)、0.45%酵母エキス(Difco社)、0.9%塩化ナトリウム、2%炭酸カルシウム、500μg/m1アンピシリンおよび50μg/m1カナマイシンからなる2KLGA生産用培地(pH7.4)10m1を含む100m1容三角フラスコに接種し、30℃で7日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清中のソルビトール、ソルボース、2KLGAおよびイドン酸を定量した。その結果、35.6mg/m1のソルビトールが残存し、13.2mg/m1の2KLGAおよび6.2mg/m1のイドン酸が生成した。ソルボースは検出されなかった。

[0096]

【発明の効果】

本発明のSLDH遺伝子を発現する組換え細胞は、Lーソルボースおよび2K LGAの発酵生産のための有用な手段となり得る。ひいてはLーアスコルビン酸 を簡単且つ大量に製造する上で極めて有用となる。

[0097]

【配列表のフリーテキスト】

配列番号3:pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号4:pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマ

ーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号5:pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号6:pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号7:pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号8:pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号9:pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号10:pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号11:pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号12:pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号13:pUCP19-HCのインサートDNAのシークエンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号14: His-tagged SLDH およびプロモーターをコードするDNA配列を 増幅するためのセンスプライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号15:His-tagged SLDH およびプロモーターをコードするDNA配列を 増幅するためのアンチセンスプライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレ オチド。

配列番号16:SLDH遺伝子の3^{*} 非コーディング領域のDNA配列を増幅するためのセンスプライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号17:SLDH遺伝子の3'非コーディング領域のDNA配列を増幅するためのアンチセンスプライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号18:SLDHのN末端アミノ酸配列。

配列番号19:SLDHコーディング配列の5'上流領域にSsp I 制限部位を 導入するためのPCRプライマー(センス)として働くべく設計されたオリゴヌ クレオチド。

配列番号20:SLDHコーディング配列の5'上流領域にSspI制限部位を 導入するためのPCRプライマー(アンチセンス)として働くべく設計されたオ リゴヌクレオチド。

[0098]

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Sorbitol Dehydrogenase, Gene Coding Thereof and UserThereof

<130> A-4029

<160> 20

<210> 1

<211> 485

<212> PRT

(213) Gluconobacter oxydans

<400> 1

Met lie Thr Arg Glu Thr Leu Lys Ser Leu Pro Ala Asn Val Gln Ala

1 5 10 15

Pro Pro Tyr Asp Ile Asp Gly Ile Lys Pro Gly Ile Val His Phe Gly

			20					25					30		
Val	Gly	Asn	Phe	Phe	Arg	Ala	His	Glu	Ala	Phe	Tyr	Val	Glu	Gln	Ile
		35					40	-				45			
Leu	Glu	His	Ala	Pro	Asp	Trp	Ala	Ile	Val	Gly	Val	Gly	Leu	Thr	Gly
	50					55					60				
Ser	Asp	Arg	Ser	Lys	Lys	Lys	Ala	Glu	Glu	Phe	Lys	Ala.	Gln	Asp	Cys
65					70					7 5		•			80
Leu	Tyr	Ser	Leu	Thr	Glu	Thr	Ala	Pro	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Val	Arg
				85					90					95	
Val	Met	Gly	Ala	Leu	Arg	Asp	Tyr	Leu	Leu	Ala	Pro	Ala	Asp	Pro	Glu
			100				•	105					110		
Ala	Val	Leu	Lys	His	Leu	Val	Asp	Pro	Ala	Ile	Arg	Ile	Val	Ser	Met
		115					120					125			
Thr	Ile	Thr	Glu	Gly	Gly	Tyr	Asn	Ile	Asn	Glu	Thr	Thr	Gly	Ala	Phe
	130					135				-	140				
Asp	Leu	Glu	Asn	Ala	Ala	Val	Lys	Ala	Asp	Leu	Lys	Asn	Pro	Glu	Lys
145					150					155					160
Pro	Ser	Thr	Val	Phe	Gly	Tyr	Val	Val	Glu	Ala	Leu	Arg	Arg	Arg	Trp
				165					170					175	
Asp	Ala	Gly	Gly	Lys	Ala	Phe	Thr	Val	Met	Ser	Cys	Asp	Asn	Leu	Arg
			180					185					190		
His	Asn	Gly	Asn	Val	Ala	Arg	Lys	Ala	Phe	Leu	Gly	Tyr	Ala	Lys	Ala
		195					200					205			
Arg	Asp	Pro	Glu	Leu	Ala	Lys	Trp	Ile	Glu	Glu	Asn	Ala	Thr	Phe	Pro
	210					215					220				
Asn	Gly	Met	Val	Asp	Arg	Ile	Thr	Pro	Thr	Val	Ser	Ala	Glu	Ile	Ala
225					230					235					240
Lys	Lys	Leu	Asn	Ala	Ala	Ser	Gly	Leu	Asp	Asp	Asp	Leu	Pro	Leu	Val
				245					250					255	1

特平11-224679

Ala	Glu	Asp	Phe	His	Gln	Trp	Val	Leu	Glu	Asp	Gln	Phe	Ala	Asp	Gly
			260					265				٠	270		
Arg	Pro	Pro	Leu	Glu	Lys	Ala	Gly	Val	Gln	Met	Val	Gly	Asp	Val	Thr
		275					280					285			
Asp	Trp	Glu	Tyr	Val	Lys	Ile	Arg	Met	Leu	Asn	Ala	Gly	His	Val~	Met
	290					295					300				
Leu	Cys	Phe	Pro	Gly	Ile	Leu	Val	Gly	Tyr	Glu	Asn	Val	Asp	Asp	Ala
305					310				•	315				•	320
Ile	Glu	Asp	Ser	Glu	Leu	Leu	Gly	Asn	Leu	Lys	Asn	Tyr	Leu	Asn	L y s
				325					330					335	
Asp	Val	Ile	Pro	Thr	Leu	Lys	Ala	Pro	Ser	Gly	Met	Thr	Leu	Glu	Gly
	٠		340					345					350 ⁴	, r.	
Tyr	Arg	Asp	Ser	Val	Ile	Ser	Arg	Phe	Ser	Asn	Lys	Ala	Met	Ser	Asp
		355	* *** ***				360	**	•			365	**. *.		
Gln	Thr	Leu	Arg	Ile	Ala	Ser	Asp	Gly	Cys	-Ser	Lys	Val	Gln	Val	Phe
	370					375					380	•			-
Trp	Thr	Glu	Thr	Val	Arg	Arg	Ala	Ile	Glu	Asp	Lys	Arg	Asp	Leu	Ser
385					390					395					400
Arg	Ile	Ala	Phe	Gly	Ile	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Met	Leu	Arg	Gly	Arg
				405	:				410					415	
Asp	Glu	Lys	Gly	Gly	Thr	Tyr	Glu	Ser	Ser	Glu	Pro	Thr	Tyr	Gly	Asp
			420					425		•			430		
Ala	Glu	Trp	Lys	Leu	Ala	Lys	Ala	Asp	Asp	Phe	Glu	Ser	- Ser	- Leu	⊵L ys ⊪
		435	j -				440					445	5		
Leu	Pro	Ala	Phe	Asp	⊳∗G l y	Trp	Arg	Asp	- Leu	Asp	Thr	- Ser	Glu	Lev	-Asp-
	450)				455	i				460).			•
Glr	Lys	Val	Ile	Val	Leu	Arg	Lys	Ile	Ile	Arg	Glı	ı Lys	s Gly	√Val	Lys.
465	i				470					475	5				480
Als	Ala	Ile	Pro	Ala	1										

485

<210> 2	
<211> 4115	
<212> DNA	
<213> Gluconobacter oxydans	
<220>	
<221> CDS	•
<222> (537)(1994)	
<400> 2	
aagcttgcat gcctgcaggt cgactctaga ggatccggtt ttggcagcgc tccctagatt	60
gatgcggcgt ctgttgaccg acatgatgct ggtggcacgt gccattgcga cggggcgtgc	120
gaccgggaac acaggcctgc tgcctttgta caaggggctg agtcatgcgc tgcgtgggct	180
ggcacatagt tgcgaagagc agttgcgcgc aaagcagaac cagcatgaac agcagtccga	240
agacgaggaa atcctcggcc tcctaccgcg attggaagag cagacccgtc ctgagatgcg	300
ttttgtgatg tccctgttcc gcgaggatct cgaacgggct gttggggtgc tcatgcgttc	360
tgatgcgagt gccgcaaaag gtctctgaac aggacgtccc gcggagggca gtcagaggtc	420
gaaatggctc ctgttgaaac cgtcattcgg tttttacgtt gtttcggggc tatgatggca	480
catgcccggc cttgtcggtc cccgtcagcg accggcccga aaccacggag aattcc atg	539
Met	
1	
att acg cgc gaa acc ctt aag tct ctt cct gcc aat gtc cag gct ccc	587
Ile Thr Arg Glu Thr Leu Lys Ser Leu Pro Ala Asn Val Gln Ala Pro	
5 10 15	
ccc tat gac atc gac ggg atc aag cct ggg atc gtg cat ttc ggt gta	635
Pr Tyr Asp Ile Asp Gly Ile Lys Pro Gly Ile Val His Phe Gly Val	

30

25

20

特平11-224679

ggt	aac	ttt	ttt	cga	gcc	cat	gag	gcg	ttc	tac	gtc	gag	cag	att	ctt	683
Gly	Asn	Phe	Phe	Arg	Ala	His	Glu	Ala	Phe	Tyr	Val	Glu	Gln	Ile	Leu	
	35					40					4 5					
gaa	cac	gct	ccg	gac	tgg	gcg	att	gtt	ggt	gtt	ggc	ctg	acg	ggc	agt	731
Glu	His	Ala	Pro	Asp	Trp	Ala	Ile	Val	Gly	Val	Gly	Leu	Thr	Gly	Ser	
50					55					60			· <u>.</u>		65	
gac	cgt	tca	aag	aaa	aaa	gcc	gag	gaa	ttc	aag	gcc	cag	gac	tgc	ctg	779
Asp	Arg	Ser	Lys	Lys	Lys	Ala	Glu	Glu	Phe	Lys	Ala	Gln	Asp	Cys	Leu	
				70					7 5					80		
tat	tcc	ctg	acc	gag	acg	gct	ccg	tcc	ggc	aag	agc	acg	gtg	cgc	gtc	827
Tyr	Ser	Leu	Thr	Glu	Thr	Ala	Pro	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Val	Arg	Val	
			85					90					95			-
					gac											875
Met	Gly	Ala	Leu	Arg	Asp	Tyr	Leu	Leu	Ala	Pro	Ala	Asp	.Pro	Glu	Ala	•
		100					105					110				
_															acg	923
Val	Leu	Lys	His	Leu	Val	Asp	Pro	Ala	Ile	Arg			Ser	Met	Thr	
	115					120					125					
					tac											971
Ile	Thr	Glu	Gly	Gly	Tyr	Asn	Ile	Asn	Glu			Gly	Ala	Phe	Asp	
130					135					140					145	
															ccg	
Leu	Glu	Asn	Ala			Lys	Ala	Asp			Asn	Pro	Glu		Pro	
				150					155					160		1007
									•						gat	
Ser	Thr	Val		_	Tyr	Val	Val			Leu	Arg	Arg			Asp	
			165				_	170					175			4445
															t cat	
Ala	Gly	Gly	Lys	Ala	Phe	Thr	' Val	Met	Ser	Cys	: Asp	ASI	ı Lei	ı Arş	g His	

		180					185					190				
aac	ggĊ	aat	gtc	gcc	cgc	aag	gcc	ttc	ctc	ggc	tat	gcg	aag	gcg	cgc	1163
Asn	Gly	Asn	Val	Ala	Arg	Lys	Ala	Phe	Leu	Gly	Tyr	Ala	Lys	Ala	Ala	
	195					200					205					
gat	ccg	gag	ttg	gCg	aag	tgg	att	gag	gaa	aac	gcg	acc	ttc	ccg	aac	1211
Asp	Pro	Glu	Leu	Ala	Lys	Trp	Ile	Glu	Glu	Asn	Ala	Thr	Phe	Pro	Asn	
210					215					220					225	
gga	atg	gtt	gat	cgc	atc	acc	ccg	acc	gtt	tcg	gcg	gaa	atc	gcc	aag	1259
Gly	Met	Val	Asp	Arg	Ile	Thr	Pr.o	Thr	Val	Ser	Ala	Glu	Ile	Ala	Lys	
				230					235					240		
aag	ctc	aac	gcg	gcc	agt	ggg	ctg	gat	gac	gac	ctg	ccg	ctg	gtg	gcc	1307
Lys	Leu	Asn	Ala	Ala	Ser	Gly	Leu	Asp	Asp	Asp	Leu	Pro	Leu	Val	Ala	
			245					250					255			٠.
gag	gat	ttc	cat	cag	tgg	gtg	ctg	gaa	gac	cag	ttt	gcg	gat	ggc	cgt	1355
Glu	Asp	Phe	His	Gln	Trp	Val	Leu	Glu	Asp	Gln	Phe	Ala	Asp	Gly	Arg	
		260					265					270				
															gac	1403
Pro	Pro	Leu	Glu	Lys	Ala	Gly	Val	Gln	Met	Val	Gly	Asp	Val	Thr	Asp	÷
	275					280					285					
															ctc	1451
Trp	Glu	Tyr	Val	Lys	Ile	Arg	Met	Leu	Asn			His	Val	Met	Leu	
290					295					300					305	1 400
															att	1499
Cys	Phe	Pro	Gly	Ile	Leu	Val	Gly	Tyr			Val	Asp	ASI		lle	•
				310					315					320		15.45
															g gat	1547
Glu	Asp	Ser	Glu	Leu	Leu	Gly	Asn			Asn	Tyr	Let			s Asp	
			325					330				_	33			1505
gto	ato	CCE	acc	ctg	aag	gCg	cct	: tca	ggc	atg	ace	g cto	ga	a gge	c tat	1595

特平11-224679

Val	Ile	Pro	Thr	Leu	Lys	Ala	Pr	Ser	Gly	Met	Thr	Leu	Glu	Gly	Tyr	٠.
		340					345					350				
cgg	gac	agc	gtc	atc	agc	cgt	ttc	tcc	aac	aag	gcg	atg	tcg	gac	cag	1643
Àrg	Asp	Ser	Val	Ile	Ser	Arg	Phe	Ser	Asn	Lys	Ala	Met	Ser	Asp	Gln	
	355					360					365			-		
acg	ctc	cgg	att	gct	agc	gat	ggc	tgt	tcc	aag	gtt	cag	gtg	ttc	tgg	1691
Thr	Leu	Arg	ŀle	Ala	Ser	Asp	Gly	Cys	Ser	Lys	Val	Gln	Val	Phe	Trp	
370					375	•				380					385	
acg	gaa	acc	gtg	cgt	cgg	gcg	atc	gaa	gac	aag	cgg	gac	ctg	tca	cgt	1739
Thr	Glu	Thr	Val	Arg	Arg	Ala	Ile	Glu	Asp	Lys	Arg	Asp	Leu	Ser	Arg	
				390					395					400	• .	
ata	gcg	ttc	gga	att	gca	tcc	tat	ctc	gaa	atg	ctg	cgt	ggt	cgc	gac	1787
He	Ala	Phe	Gly	Ile	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Met	Leu	Arg	Gly	Arg	Asp	
			405					410			•		415			
gag	aag	ggc	ggg	acg	tat	gaa	tcg	tcc	gag	ccg	act	tat	ggc	gac	gcc	1835
Glu	Lys	Gly	Gly	Thr	Tyr	Glu	Ser	Ser	Glu	Pro	Thr	Tyr	Gly	Asp	Ala	
		420				*	425	ı			•	430)			•
gaa	tgg	aag	ttg	gcc	aag	gcg	gac	gac	ttc	gaa	ago	tct	ctg	aag	ctc	1883
Glu	Trp	Lys	Leu	Ala	Lys	Ala	Asp	Asp	Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Lys	Leu	
	435	,				440)				445	5				
ccg	gcg	ttc	gat	ggg	g tgg	cgc	gat	ctg	gat	acg	tco	gaa	ctg	gat	caa	1931
Pro	Ala	Phe	Asp	Gly	, Trp	Arg	Asp	Leu	ı Asp	Thr	Sei	r Glu	ı Lev	ı Ası	Gln	
450	,				455	;				460)				465	
aag	gto	ato	gtg	ctg	g Cgg	aag	ato	ato	cgo	gaa	a aag	g gg	gta	aaa	a gcc	1979
Lys	. Val	Ile	Val	Let	ı Arg	Ly:	s Ile	e Ile	Arg	Glu	ı Ly:	s Gl	y Val	Ly:	s Ala	
				470)				475	5				480	0	
gco	ato	ccg	gco	c tga	a ati	cgg	ettt	tagg	ggtag	gcg a	actg	aaac	ag aa	aaac	cgcgc	2034
Ala	ı Ile	e Pro	Ala	3												
			485	5												

tctggaagga gcgcggtttt ttttatgctc agatctgtcc catcaggaca aggatcacga 2094 cgaccacgat caggacaagt ccgctggagg gggagcccca tttcgaactg tacggccatg 2154 acggcagcgc accgagatca ggattacaag aaggatcagt cccatggcac atctctcttg 2214 ccggttgaga ctggtctgtg ttccgggtgt ctaaaaagtt tccgtagggg cgcgaaagat 2274 caaagetgte ggtegegett aateeggtee caageegeat tgatgeggge caeeeggtee 2334 tgtgcgcgtt tgcgctctgt ctctgacata ggtttctggg ccagcacgtc cggatgatgt 2394 tcgcggatca gggtgcgcca gcgcacgcgg atttctgtgt cagttgcgct gcgggtgatg 2454 ccgagaatac gataggcatc cggctcgttt ccgctggcgg cgcgattgtt gccgctttcg 2514 gcccggtccc atgctcctgg cggcaggcca aatgccccgt gaacgcgctg cagaaaatcg 2574 atttccttcg ggtgaagctc gcggctgggg ccggcatcgg cacgggcgat acggaacagt 2634 gccgtcatga ggttctcaag cggcgccgta ttatcggcat aggccttgcc catttcgcgg 2694 gcatacatct cgaaatcgtc cgtccggtcg cgggcgcgat cgaacagcat gccgacttcc 2754 ttggtgttat cgggggggaa ctggaagcag gtcttgaaag cgttgatttc gtgtcggttc 2814 accggcccgt cgatcttcgc cagcttcgcg cacagggcaa caaggccgat ggcgtaaagc 2874 tgatctcgtt tgcccagggc cgcagcaatc ttggcagcgc cgaaaaaaggc cgcgctgttg 2934 ggatcgggac ggccattcgc gggaaagcgc tcactccagc cgcccgttga gggcttgagt 2994 agcgaaccgt tatcggcggc atgccccagc gctgcgccca tcagtgctcc gaaaggacca 3054 ccaaccgcga agcccgcgac accaccgaac atcttgcccc agatagccat gtcatcaacc 3114 tagcacgccc gctcacagcg gcaaatgaca gatcgcaggc taggtgtagg tgctgatgcg 3174 ccaaccgccc gggcttgcgg tgtggtagaa gctaggagtt acgaacttat cgctgtctca 3234 tgcttttgag gcgcaggttc ttctgttcgt ttcatgacgg atatttttat gcccaccttg 3294 atccagactg ctacttcgat ccctttccgc tctgatgacg aactgatgga tcttttgatc 3354 aagcgtctgc caatgtggct gcagaaagtg ctgaactggt tgcgggaagc ggatcataaa 3414 tgggttcgga ttccggcggg cgtgctgttc atgctgggcg gcgttctgtc catcctgcct 3474 gttctgggtc tgtggatgct gccggtcggc gtgatgttgc ttgcgcagga tattccgttc 3534 ttccgtcgcc ttcagggccg cctcttgcgc tggatcgaac gtcaacatcc ggattggctg 3594 ggccttccgg cgaaaagcgg cagaagctaa ccgttcgtct ggacgtgttt ctgaagatgt 3654 gtcagtgctg caacccgcag ggctgaagcc agtgggcgct ctggtggtcg cgcggcatcg 3714 agagaagcca ccagagacgc aaagctctgc tggcggactg cggccatcgc gtccagtata 3774 gcccagaact cgggttccag tgccacggac gtccggtgtc ctgacagaa caggctgcgt 3834
ttgacgagat cactcattcc ggttgtttct caaggcgctt caaagcccat tgtgcggttt 3894
cggaaacatc agggtccgga tcactcagca gctcccgcg agaagatata agcgacggat 3954
cggccgagtt gccgatcgcg atcaggacag ttacgtacga accggttgcg tccaatccgt 4014
ttgaccggag agccagaaaa aaacgtccgg aatgtcgcat tatccagccg caccagttcg 4074
tcgagttttg gtgcaatcag ctccggcgg gcctgaagct t 4115

⟨210⟩ 3

⟨211⟩ 16

<212> DNA

(213) Artificial Sequence

<220>

(223) Oligonucleotide designed to act—as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

<400> 3

gctgctgagt gatccg 16

<210> 4

(211) 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

(223) Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

<400> 4

gactgctact tcgatcc 17

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

(223) Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

<400> 5

cctacaccta gcctgc 16

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

(223) Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

<400> 6

cagtgccgtc atgagg 16

<210> 7

⟨211⟩ 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

(223) Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

<400> 7

tcctgatctc ggtgcg 16

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

(213) Artificial Sequence

<220>

(223) Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert
DNA of pUCP19-HC.

<400> 8

gatgetteag caegge 16

<210> 9

⟨211⟩ 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucle tide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

```
<400> 9
                    16
gacgatcacg gaaggc
<210> 10
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert
       DNA of pUCP19-HC.
<400> 10
                     16
ggttacgtgg tcgacg
<210> 11
⟨211⟩ 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
       Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert
<223>
       DNA of pUCP19-HC.
<400> 11
ctatacctga caggtcc
                      17
```

<210> 12

16

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

(223) Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

<400> 12

gcgcgatctg gatacg 16

⟨210⟩ 13

<211> 16 ··

<212> DNA-

(213) Artificial Sequence

<220>

(223) Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert DNA of pUCP19-HC.

<400> 13

cgaggatete gaacgg 16

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sense primer f r amplifying

DNA sequence encoding His-tagged SLDH and promoter.

<400> 14

cggattgcta gcgatggc 18

⟨210⟩ 15

<211> 47

<212> DNA

(213) Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as antisense primer for amplifying DNA sequence encoding His-tagged SLDH and promoter.

<400> 15

atcgaggatc ctcaatgatg atgatgatga tgggccggga tggcggc 47

<210> 16

⟨211⟩ 30

<212> DNA

(213) Artificial Sequence

<220>

(223) Oligonucleotide designed to act as sense primer for amplifying DNA sequence of 3' non-coding region of SLDH gene.

<400> 16

atcgaggatc cattcggctt ttagggtagc 30

<210> 17 <211> 28 DNA <212> Artificial Sequence <213> <220> Oligonucleotide designed to act as antisense primer for <223> amplifying DNA sequence of 3' non-coding region of SLDH gene. <400> 17 28 tagctgagct catgggacag atctgagc <210> 18 ⟨211⟩ 10: <212> PRT Gluconobacter oxydans <213> <220> <223> N-terminal amino acid sequence of SLDH. <400> 18 Met Ile Thr Arg Glu Thr Leu Lys Ser Leu 5 10 1 <210> 19 ⟨211⟩ 33

<212>

<213>

DNA

Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (sense) for introducing Ssp I restriction site into 5' upstream region of SLDH coding sequence.

<400> 19

taggaatatt tctcatgatt acgcgcgaaa ccc 33

<210> 20

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (antisense) for introducing Ssp I restriction site into 5' upstream region of SLDH coding sequence.

<400> 20

gatgcttcag cacggc 16

【図面の簡単な説明】

【図1】

L-アスコルビン酸合成の反応スキームを示す図である。図中、Rはアルキル基を表す。

【図2】

プラスミドpUCP19-B7SX2およびpUCP19-HCのDNAインサート部分の制限酵素地図、並びにpUCP19-HCのDNAインサート部分のシークエンス・ストラテジーを示す図である。

【図3】

プラスミドpUCP19-SLDHの遺伝子地図を示す図である。

【図4】

発現ベクターpSDH-tufB1-Eco-d9Uの遺伝子地図を示す図である。

【図5】

発現ベクター p B B R (K m) - S D H・S N D H の遺伝子地図を示す図である。

【図6】

発現ベクター p B B R (T c) - S D H・S N D H の遺伝子地図を示す図である。

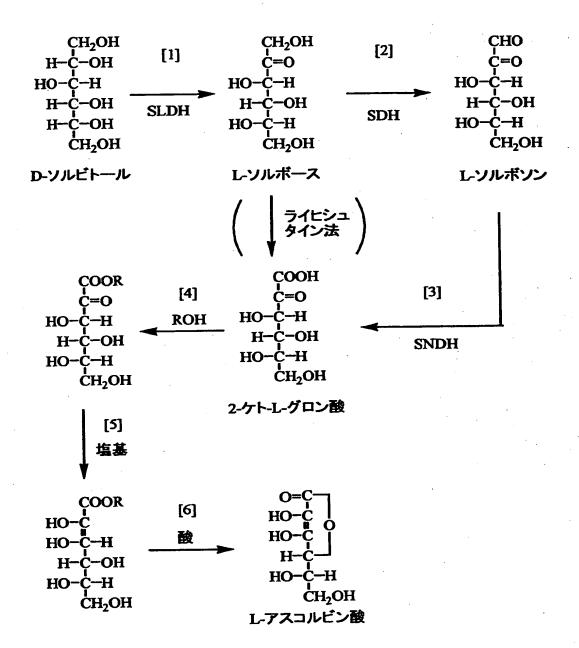
【図7】

発現ベクター p U C P 1 9 - S D H・S N D H の遺伝子地図を示す図である。

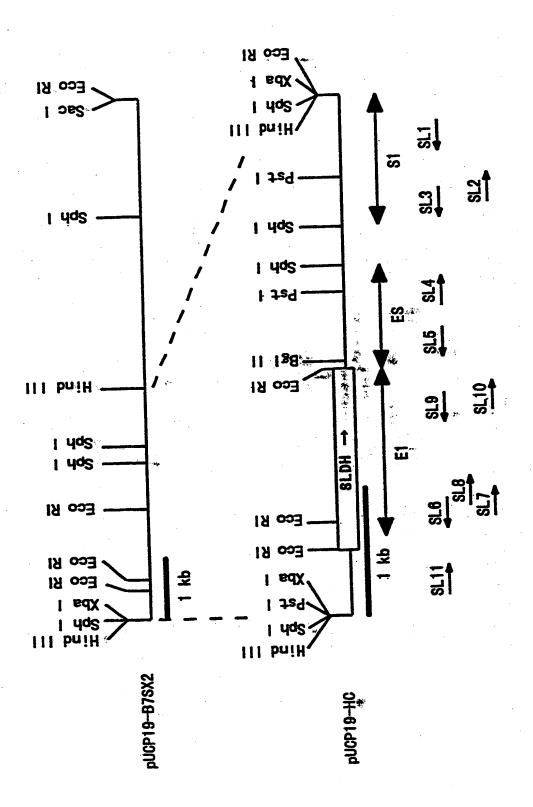
【書類名】

図面

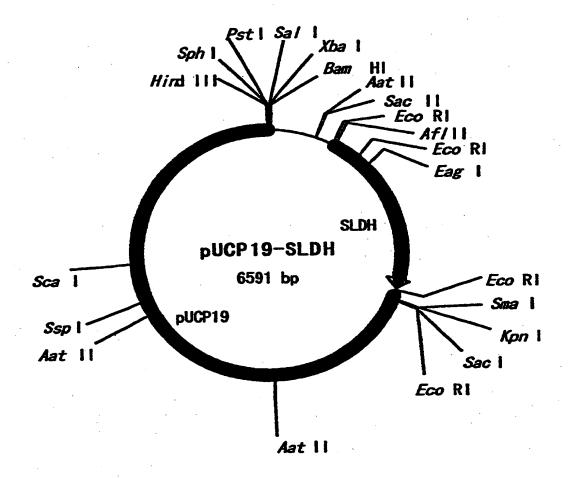
【図1】



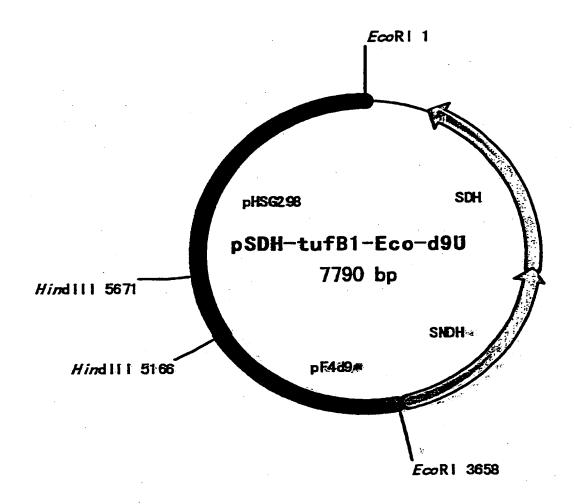
【図2】



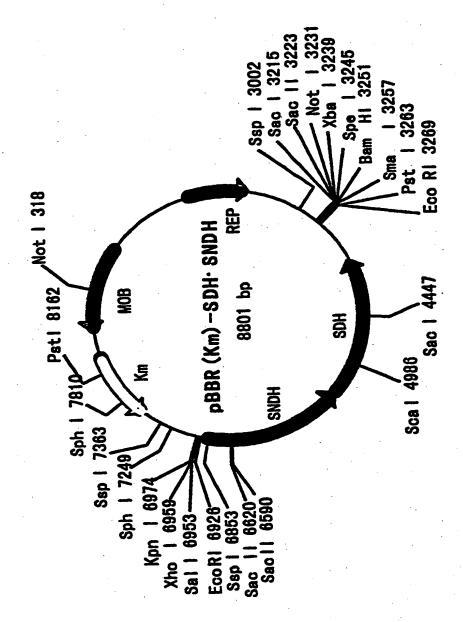
【図3】



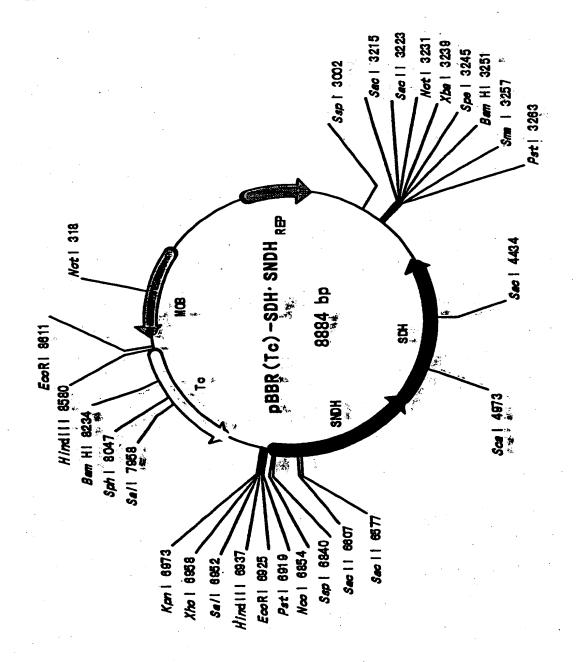




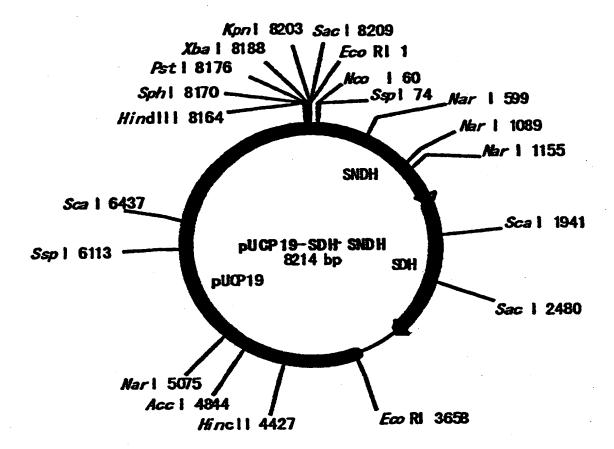
【図5】







【図7】





要約書

【要約】

【解決手段】 D-ソルビトールデヒドロゲナーゼ (SLDH) をコードする遺伝子、該遺伝子を発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養することによる SLDHの製造方法、ならびに該培養物を用いたL-ソルボースまたは2-ケトーL-グロン酸の製造方法。

【効果】 本発明によれば、L-アスコルビン酸の前駆物質である2KLGAを 簡単に且つ効率よく発酵生産することができる。

【選択図】

なし



識別番号

[000005245]

1. 変更年月日

1990年 8月17日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号

氏 名

藤沢薬品工業株式会社

THIS PAGE BLANK USPIO